

Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses
Neukölln, Berlin - Neukölln
Direktor: Prof. Dr. K. Holldack

OPTISCHE UND HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN AN GLANZKÖRNERN
IN KULTIVIERTEN KNOCHENMARKZELLEN UND PHYTOHAEMAGGLUTININ-
STIMULIERTEN LYMPHOCYTEN

INAUGURAL + DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Albrecht B e i s s e l
Eschweiler,

1969



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548620_0049

Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses
Neukölln, Berlin - Neukölln
Direktor: Prof. Dr. K. Holldack

OPTISCHE UND HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN AN GLANZKÖRNERN
IN KULTIVierten KNOCHENMARKZELLEN UND PHYTOHAEMAGGLUTININ-
STIMULIERTEN LYMPHOCYTEN

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Albrecht B e i s s e l
Eschweiler

Dekan: Professor Dr. med. Hans H. N a u m a n n

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Irene B o l l

Korreferent: Professor Dr. med. Hans-Joachim Clemens



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 15. September 1969

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Fragestellung und interpretierende Zusammenfassung der zitierten Glanzkorn-Beschreibungen	7
III. Material und Methode	9
a) Materialgewinnung und Inkubation	9
b) Untersuchungsmethoden	10
1. Lebendbeobachtung und optisches Verhalten	10
2. Die Supravitalfärbung mit Janusgrün B	11
3 a Fixierung, Färbung und Löslichkeitsverhalten der Glanzkörner in Übersichtspräparaten	11
3 b Untersuchung von Färbung und Löslichkeitsverhalten der Glanzkörner unter optischer Kontrolle	14
c) Optische Hilfsmittel und Dokumentation	15
IV. Ergebnisse (geordnet wie III,b)	17
V. Diskussion der angewandten Methoden und ihre Aussagekraft über Glanzkörner	30
VI. Zusammenfassung	46
VII. Literaturverzeichnis	47

I. Einleitung:

Gall'sche Körperchen, Lymphocyten-Glanzkörner, Plasmazell-Lipochochondrien und Beschreibungen des Glanzkorn-Phänomens in Blut- und Knochenmarkzellen.

1936 beschrieb GALL (22) im Lymphocytenplasma das gelegentliche Auftreten von ein - selten mehr - beweglichen, etwa 0,5 μ großen, stark lichtbrechenden "Einschlüssen", die er nur mit supravitaler Neutralrotfärbung mahagonirötlich darstellen konnte. Er fand diese Struktur relativ konstant in 34 - 39 % der Lymphocyten bei Gesunden und Patienten mit unterschiedlichen Krankheiten (Rheuma, Pneumonie, Diabetes mellitus, Herzfehler, Trichinose, Tuberkulose, lymphatische Leukaemie und M. Hodgkin); lediglich in Fällen mit infektiöser Mononucleose beobachtete er ein auf 6 - 13 % erniedrigtes Vorkommen. Färbeversuche mit Methylenblau, Eosin, Azur, Sudan III, Osmiumsäure, Janusgrün, Bismarckbraun und Jodlösung mißlingen. GALL räumte ein, schwache Färbefeffekte aufgrund der starken Lichtbrechung eventuell nicht erkannt zu haben. Nach Vorbehandlung mit Methyl- und Äthylalkohol waren die Körperchen nicht mehr nachweisbar, doch sah er manchmal entsprechende, optisch leere Räume. GALL schloß, daß diese Granula, da er weder Fett noch Eiweiß darin wahrscheinlich machen konnte, noch nicht beschriebene Cytoplasmabestandteile enthalten mußten. In länger stehendem Blut vermehrten sich die Körperchen nicht.

HEMPELMANN und KNOWLTON (23), die die Neutralrot-Granula in Lymphocyten eingehender untersuchten, unterschieden die Gall'schen Körperchen von den Neutralrot-Vacuolen durch dunklere Tönung und höheren Brechungsindex (zwischen 1,45 und 1,48). Bei Mischung von Vollblut, 10-%igem Formalin und Farblösung (aa) konnten sich die Gall'schen Körperchen mit gesättigtem Sudanschwarz in 70-%igem Äthanol schwach anfärben, mit 2-%iger Osmiumsäure erhielten sie eine Schwär-

zung. Wässrige Nilblaulösung stellte nur die auffallend großen Granula schwach blau dar. Die basischen Supravitalfarbstoffe Methylenblau, Toluidinblau und Pyronin Y sowie das erwähnte Neutralrot färbten die Granula an; Versuche, sie mit Janusgrün und Trypanblau darzustellen, mißglückten. Löslich waren die Körperchen in reinem Methanol und 70- bis 100-%igem Äthanol, in Aceton und Chloroform. Sie nahmen daher an, daß die Granula Lipide enthielten. Die relative Häufigkeit der dunklen Neutralrot-Granula betrug nach ihren Zählungen 32 % mit je 1 Granulum und 9 % mit mehr als 1 Granulum. Bei längerer Einwirkung von Neutralrot fanden sie eine Erhöhung der Granulazahl, was TROWELL (58) auf eine toxische Wirkung des Neutralrots in der Art einer Lipiddemaskierung bezogen hat. Im übrigen bestätigte er, daß die Autoren trotz einzelner Diskrepanzen - die durch verbesserte Methodik bedingt waren - Gall'sche Körperchen beschrieben haben. Neutralrotaufnahme in wachsenden und häufiger werdenden dunkleren Granula hat MEDEWAR (37) bereits beschrieben, auch ACKERMANN (1) berichtete hierüber.

NOELLER (40) fand 1952 in 25 % der Lymphocyten von Patienten, die an Hepatitis epidemica erkrankt waren, bei Betrachtung im positiven Phasenkontrast neben kleinen, fädigen, grauen, unscharf begrenzten Körnchen, die vorwiegend im Bereich der Kerninzisur lagerten, und wenigen, schwarzen, schräff begrenzten Körnern eine dritte Granulaform, die er wegen ihres optischen Verhaltens als Glanzkörner bezeichnete. Er beschrieb diese Varia als etwa $1/2 \mu$ große, runde Gebilde, deren Zentren hell aufleuchten, und äußerte die Vermutung, daß dieser zentrale Glanz durch "eine Phasenverschiebung von mehr als einer halben Wellenlänge über den Bereich der Dunkelheit hinaus" hervorgerufen wird.

LENNERT (30) hat die Gall'schen Körperchen den Noeller'schen Glanzkörnern gleichgesetzt. Auch BESSIS (5) bezeichnete die in seinen Abbildungen phänomenologisch als Glanzkörner identifizierbaren Granula als "Corp's de Gall". STOBBE (56) setzte ebenfalls die von ihm beschriebenen

"Lipochondrien" (= Glanzkörner) den "Neutralrot-Granula des angloamerikanischen Schrifttums" gleich. RIND (46) meinte jedoch, weil er die Lymphocyten-Glanzkörner mit Färbeverfahren darstellte, die GALL mißlangen, daß es sich um verschiedene Strukturen handelte. Aus Abbildungen einer Arbeit von ROSSE und YOFFEY (49), in der Lymphocytenübergangsformen successive im positiven Phasenkontrast und, nach Einwirkung von Neutralrot, im Hellfeld dargestellt wurden, ersahen wir eindeutig, daß die dunklen Neutralrot-Granula Glanzkörner waren.

RIND (45) hat 1955 das physikalische und färberische Verhalten der Glanzkörner, die er nur in 1 - 5 % der Lymphocyten gesunder Kinder fand, untersucht und charakterisierte sie folgendermaßen:

1. Bei Betrachtung im Hellfeld erscheinen die Glanzkörner je nach Fokussierung als 0,5 bis 2 μ große helle oder dunkle Punkte; im Dunkelfeld sind sie als helle Tropfen zu erkennen. Doppelbrechung zeigen sie nicht; im positiven Phasenkontrast ist (meist) der zentrale, helle Glanz sichtbar, den ein sehr dunkler Randwall umgibt. Das Verhalten im negativen Phasenkontrast beschreibt er in dieser Arbeit nicht, jedoch finden wir in seinem Atlas (46) eine simultane Darstellung von Glanzkörnern eines Gumprecht'schen Kernschattens im positiven Phasenkontrast und im Anoptalkontrast. Bei dieser, dem negativen Phasenkontrast verwandten Darstellung erscheinen Glanzkörner homogen hell und sind von anderen gleich großen und gleich stark lichtbrechenden Granula nicht zu unterscheiden.
2. Supravital färbbar sind Glanzkörner mit Toluidinblau, mit Neutralrot und Methylenblau. Die Supravitalfärbung mit Janusgrün stellt sie grün-blau wie Mitochondrien dar.
3. Fluoreszenz zeigen sie nach Fluochromierung mit Neutralrot, Malagarot, Thioflavin S und Phosphin wie Fett enthaltende Strukturen.

4. Alkohole (Methanol, Äthanol, Propanol) und Äther-Äthanol lösen sie, Wasser und Formol oder Formol-Alkohol spülen sie aus den Zellen heraus. Osmiumsäure wirkt schwärzend ein. Struktur erhaltende Fixierung von Ausstrichen gelingt durch Formol- oder Osmiumdampf.

5. Mit den gebräuchlichen haematologischen Färbeverfahren (Giemsa, Pappenheim) sind Glanzkörper nicht darstellbar. Sie sind Peroxydase negativ. Die herkömmlichen Fettfärbemittel Sudan III (nach DADDI) und Sudanschwarz B (nach LISON) färben sie nicht an; aber mit Sudan- α -Naphthol nach GOLDMAN und mit Sudanschwarz B nach BERENBAUM (Burnt-Sudan-Black-Methode) sind Glanzkörper darzustellen.

RIND meinte, daß es sich bei der Inhaltssubstanz der Glanzkörper um maskierte Lipide - wahrscheinlich Fett-Eiweiß-Verbindungen - handelte und daß sie aus Mitochondrien hervorgegangen waren, weil er sie mit Janusgrün darstellen konnte. Er bezeichnete sie daher als Lipochondrien. Da er die Glanzkörper bei Störung der Leberfunktion vermehrt fand, schloß er auf eine von der Leberfunktion abhängige Sonderstellung im Lymphocytenstoffwechsel.

WENNIG (59), der daran anknüpfte, bewies eine Abhängigkeit zwischen Lymphocyten-Glanzkornwert und Lipoperoxydspiegel und hielt deshalb die Lymphocyten-Glanzkörper für zellspezifische Varia. Er vermutete ursächliche Beziehungen zwischen der Glanzkornentstehung und einer Leberzellschädigung, da er bei Hepatitis epidemica eine signifikante Erhöhung beider Werte ermittelte. Im Mäuseversuch konnte er durch Phosphorsäureschädigung der Leber eine gleichsinnige Erhöhung dieser beiden Werte erzeugen. Bei Gaben leberwirksamer Aminosäuren (z.B. Cystein) wurden Lipoperoxydspiegel und Lymphocyten-Glanzkornwert gleichermaßen erniedrigt.

Bereits GALL (22) fand die von ihm beschriebenen Körperchen in 3 % der Plasmazellen; gelegentlich ermittelte er sie

auch in Monocyten. BESSIS (5) erwähnte Gall'sche Körperchen auch in Lymphoblasten und in geringerer Zahl in anderen lymphoiden Zellen. ACKERMANN (1) schilderte in Plasmazellen eine den Gall'schen Körperchen in Größe, optischer Dichte und Färberverhalten gegen Neutralrot entsprechende Struktur. STOBBE (55) ermittelte in Plasmazellen - in größerer Zahl gelegentlich in Plasmocytomzellen - phasenoptisch erkennbare Glanzkörner, die durch starke Lichtbrechung, Osmiophilie und Vitalfärbbarkeit mit basischen, lipophilen Farbstoffen das Vorhandensein von Fett erkennen ließen und die er aufgrund ihrer Vitalfärbbarkeit mit Toluidinblau als Lipochondrien bezeichnete. Er hat hervorgehoben, daß die für reife Plasmazellen fast typischen, bei panoptischer Färbung auftretenden großen, peripheren Vacuolen - oft als Fetttropfen bezeichnet - solche Glanzkörner waren. Entsprechende sudanophile Granula beschrieben QUAGLINO u.a. (43) in einem kleinen Teil atypischer Plasmoblasten bei einem Plasmocytom-Kranken.

In den Abbildungen des RIND'schen Atlas' (46) der Phasenkontrasthaematologie fanden wir unter den positiven Phasenkontrastbildern Glanzkörner in

1. Lymphocyten,
2. Monoblasten und Monocyten,
3. Plasmazellen,
4. Parablasten,
5. Proerythroblasten und Erythroblasten,
6. Promyelocyten, eosinophilen und neutrophilen Granulocyten,

sowie in

7. Retikulumzellen und Gewebsmastzellen.

Die Photographien wurden 10 - 15 Minuten nach Herstellung eines Tupf-Quetsch-Präparates aus lebendfrischem Material,

also an supravitalen Zellen gewonnen.

In der Koagulumkultur beobachtete BOLL in Knochenmarkzellen und in Phytohaemagglutinin-stimulierten Lymphocyten häufiger Glanzkörner. Bereits 1958 hat sie in ihren Arbeiten derartige Granula in Lymphocyten (14) und Granuloblasten (8) beschrieben. In einem Granuloblasten, dessen Ausreifung sie in allen Entwicklungsstufen bis zum Segmentkernigen verfolgen konnte, sah sie in jeder der auftretenden Reifungsstufen Glanzkörner (9). In den Zellen der Erythropoese fand sie ebenfalls in allen Entwicklungsstufen Glanzkörner (12). Besondere Beobachtung widmete sie dem Phänomen an Plasmazellen, wo sie ihre vermutliche Bildung kinematographisch verfolgen konnte, 12 bis 16 Stunden nach Herstellung des Beobachtungspräparates bemerkte sie kleinere, phasenpositive Granula, die je nach Fokussierung auch hell erschienen, nach 19 Stunden traten größere, runde Partikel auf mit phasenpositivem Rand und glänzendem Zentrum. Da gleichzeitig mit der Bildung dieser Granula Oberflächenaktivität und Zellvergrößerung nachweisbar waren, die BOLL als Pinocytose deutete, vermutete sie einen Zusammenhang zwischen Pinocytose und Glanzkornbildung. Besonders bemerkenswert fand sie, daß bei Teilung der beobachteten Plasmacytomzelle die Glanzkörner verschwanden und von den Tochterzellen erst nach einiger Zeit neu gebildet wurden. Glanzkörner in Phytohaemagglutinin-stimulierten Lymphocyten hat sie erstmals 1967 (14) abgebildet. Diese Beobachtung von Glanzkörnern in stimulierten Lymphocyten stimmte mit Beobachtungen TANAKA's u.a. (57) überein. Schließlich sah sie dieses Phänomen sogar in malignen Mesothelien (11), und hier gelang ihr eine Gelbfärbung mit Toluidinblau.

II. Fragestellung und interpretierende Zusammenfassung der zitierten Glanzkorn-Beschreibungen:

NOELLER definiert die Glanzkörner überwiegend phänomenologisch, indem er ihre zentrale Aufhellung, die nur bei Betrachtung im positiven Phasenkontrast sichtbar ist, in den Vordergrund seiner Beschreibung stellt. Dieses Glanzkorn-Phänomen ist nicht lymphocytenpezifisch. Die meisten Arbeiten enthalten Hinweise auf spontane Beobachtungen von Glanzkörnern in verschiedenen haematologischen Zellen: RIND findet sie bei Supravitalbeobachtungen; BOLL stellt fest, daß in ihren Kulturen Glanzkörner in den Zellen der Granulocyto- und Erythropoese und in Phytohaemagglutinin-stimulierten Lymphocyten auftreten, und daß diese Glanzkörner rückbildbar sind.

Ein Merkmal wie das Aufleuchten der Granulazentren unter bestimmten äußeren Beobachtungsbedingungen kann rein zufälliges Epiphänomen strukturell verschiedener Granulaarten sein. Wenn wir Morphologie nicht als bloße Gestaltenlehre, sondern wie z.B. LETTERER als die Lehre von Bau und Funktion belebter Materie verstehen, berechtigt ein solches Merkmal nicht zum Schluß auf morphologische Identität von Strukturen, sondern ist günstigenfalls im Sinne eines Äquivalentbildes ein Hinweis auf mögliche morphologische Gemeinsamkeiten, die es nachzuweisen gilt. Bisher ist lediglich die strukturelle Gleichheit von Lymphocyten- und Plasmazell-Glanzkörnern erwiesen. RIND, der an Lymphocyten-Glanzkörnern Beziehungen zu Mitochondrien und das Vorkommen maskierter Lipide aufdeckt, ersetzt die phänomenologische Bezeichnung NOELLER's durch eine morphologische Benennung, die die Aussage über vermutliche Herkunft und kennzeichnenden Bestandteil dieser Varia zu dem Begriff "Lipochondrien" zusammenfaßt. Diese morphologische Erkenntnis ermöglicht methodisch den Vergleich der Glanzkörner in verschiedenen Zellen. STOBBE untersucht Plasmazell-Glanzkörner und stellt fest, daß sie ebenfalls Lipochondrien sind. Es liegt nahe, die Prinzipien der RIND'schen Untersuchungen auf die Glanzkörner in anderen Zel-

len anzuwenden, nachdem bewiesen ist, daß dem Phänomen in zwei verschiedenen Zellarten - die allerdings auch andere Ähnlichkeiten vermuten lassen - das gleiche morphologische Substrat zugrunde liegt. Daher versucht diese Arbeit, den histochemischen-färberischen Vergleich der in den Kulturen beobachteten Glanzkörper mit den Lymphocyten- und Plasmazell-Lipocondrien.

Wir fragen:

1. In welchen Blut- und Knochenmarkszellen finden wir Glanzkörper; entsprechen diese einander in weiteren optischen Eigenschaften ?
Unter welchen Umständen treten sie auf oder verschwinden sie ?
2. Wie verhalten sich die Glanzkörper der verschiedenen Zellarten gegenüber der Janusgrün-Färbung ?
3. Welche Färbeverfahren (speziell für Fette und maskierte Lipide) stellen die beobachteten Glanzkörper dar und wie verhalten sie sich gegenüber Fettlösungsmitteln ?
4. Welche Rückschlüsse auf Bau und Funktion der Glanzkörper dürfen wir aus dem beobachteten Verhalten ziehen ?

III. Material und Methode:

a) Materialgewinnung und Inkubation

Beobachtungsgut sind

α) Knochenmarkszellen von Patienten, die an β -Plasmocytom (R., Otto, 74 Jh.), chronischer lymphatischer Leukaemie (W., Friedrich, 80 Jh.), beginnender Lymphadenose (M., Albert, 72 Jh.) und nephrogener Anaemie (H., Walter, 67 Jh.) leiden sowie Zellen aus dem Knochenmark einer Potatorin mit angeregter Erythropoese (R., Hedwig, 42 Jh.), eines Tumor-Patienten (T., Paul, 69 Jh.), zweier Patienten mit normalem Markbefund (F., Emma, 71 Jh. und K., Marion, 33 Jh.).

β) Phaseolin-stimulierte (20) Lymphocyten von Patienten, die an Leberparenchymschaden und nephrogener Anaemie (K., Walter, 66 Jh.), beginnender Lymphadenose (M., Albert, 72 Jh.) und Osteomyelosklerose (P., Frieda, 64 Jh.) erkrankt sind.

Zu α : Die Knochenmarkszellen gewinnen wir mit der üblichen Punktionstechnik aus dem Sternalmark. Das lebendfrische Material wird in 0,3-mg%iger Hank-Heparin-Lösung aufgefangen. Die Züchtung erfolgt bei 37° C nach der von BOLL modifizierten Carrel'schen Technik (13):

Unter handsterilen Bedingungen werden flache Koagula aus

50 % isologem Nativplasma (gewonnen durch Sedimentation von Vollblut in Silikonröhrchen bei 7° C)

10 % Corrhormon (dreifach konzentriertes Präparat der Chemiewerke Homburg) und

40 % Hank'scher Lösung (nach Pulvertaft)

auf normalen 77 x 26 mm Objektträgern hergestellt. Das Zellmaterial wird in einem isologen Serumtröpfchen auf das Koagulum gelegt und nach Abdecken mit einem paraffinumrandeten Hohlschliffobjektträger und Umdrehen der Gläser im hängenden Tropfen für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert.

Zu β : Das Zellmaterial für die Phytohaemagglutinin- (31) stimulierten Lymphocytenkultur erhalten wir aus dem Überstand von 20 ml, für einige Stunden bei 37° C sedimentierten Venenblutes, dessen Gerinnung mit 3 Tropfen Liquemin (5000 IE Heparin/ml) verhindert wird. Die Züchtung erfolgt mit einer abgewandelten Nowell'schen Technik (41) in flüssigem Medium aus

- 2,0 ml leukocytenhaltigem Plasma
- 8,0 ml Eagle's minimum Medium
- 0,2 ml Phytohaemagglutinin M (Fa. Difco) und
- 0,3 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung (1 g Streptomycin und 1 Mill. E. Penicillin pro 100 ml Hank'scher Lösung)⁺.

Die Inkubation erfolgt mit großer Gasphase bei 37° C für mehrere Tage. Zur Rückgewinnung des Zellmaterials zentrifugieren wir 5 Minuten bei 500 U/Min., danach wird der Bodensatz in den Zentrifugengläsern abpipettiert.

b) Untersuchungsmethoden

1. Lebendbeobachtung und optisches Verhalten:

Das Zellmaterial wird nach verschiedenen Inkubationszeiten auf flach ausgezogene Koagula, deren Zusammensetzung oben beschrieben ist, aufgebracht und mit dem Deckglas unter sanftem Andruck ausgebreitet. Verdunstungsschutz ist durch Paraffinumrandung gewährleistet. In diesen sog. "platten Präparaten" (BOLL 13) werden bei Betrachtung im positiven

⁺ Ähnlich wie PÖSSNEROVA (42) haben wir das allgemein angewandte TC 199 (Fa. Difco) durch ein Medium - hier Eagle's Medium, das bereits ASTALDI (3) anwandte - ersetzt, dessen pH-Stabilität geringere Abhängigkeit vom CO₂-Gehalt der Gasphase besitzt, wodurch die Begasung der Kultur mit 5-%igem CO₂-Gemisch entfällt.

Phasenkontrast Glanzkörner gesucht und die entsprechenden Zellen nach den Abbildungen des RIND'schen Atlas' der Phasenkontrasthaematologie (46) diagnostiziert. Diejenigen Glanzkörner, deren Lageveränderung gering ist, werden successiv im Hellfeld, im Dunkelfeld und polarisationsoptisch betrachtet.

2. Die Supravitalfärbung mit Janusgrün B (modifiziert nach COWDRY (16)):

Nach 48-stündiger Inkubation bringen wir die Zellen auf einem Objektträger in ein Tröpfchen blutisotoner Janusgrün-Lösung. Nach 5 - 10 Minuten Wartezeit in einer feuchten Kammer wird ein Deckglas aufgelegt und mit Paraffin umrandet. Die Auswertung der Präparate erfolgt, unmittelbar nach dem Abdecken, im Hellfeld. Die Janusgrün-Lösung enthält

1 g Janusgrün in 40 l 0,9-%iger Kochsalz-
Lösung (1 : 40.000)

und wird in einer Verdünnungsreihe hergestellt.

3 a. Fixierung, Färbung und Löslichkeitsverhalten der Glanzkörner in Übersichtspräparaten:

Von 24 und 48 Stunden alten Kulturen stellen wir durch Auseinanderdrängen zwischen 2 Objektträgern dünne Ausstriche her.

Mit Ausnahme der panoptischen Färbung, der Osmiumversuche und der Löslichkeitsversuche fixieren wir die Ausstriche nach dem Antrocknen (20 Minuten) durch 10 Minuten langes Einstellen in den Dampf einer frischen 40-%igen Formalin-Lösung wie SHEEHAN und STOREY (54).

Zur Osmierung nach WEIDENREICH streichen wir auf Osmiumdampf-geräucherten Objektträgern aus (2 Minuten in Osmiumdampf aufbewahren !) und stellen diese Ausstriche für 1 - 2 Minuten mit der Schichtseite dicht über dem Flüssigkeits-

spiegel in den Dampf einer 1-%igen Osmium-Lösung, der wir einige Tropfen Eisessig zusetzen. Diese Methode ist bei ROMEIS (48) beschrieben.

Panoptische Färbung nach PAPPENHEIM: Lufttrockene Ausstriche (24 Stunden alt) werden 3 Minuten mit gesättigter May-Grünwald-Lösung in 100-%igem Methanol (Fa. Merck) behandelt, anschließend wirkt eine 1 : 5 verdünnte Giemsa-Lösung (Fa. Merck) 6 Minuten ein. Diese Methode ist bei ADAM und CZIHAK (2) entnommen.

Sudan-III-Färbung nach DADDI (entnommen bei ADAM und CZIHAK (2)): Formoldampf-fixierte Ausstriche werden kurz (30 Sekunden) mit 50-%igem Äthanol abgespült und danach bei Zimmertemperatur 2 - 5 Minuten in Sudan-III-Lösung getaucht. Die Farblösung wird durch Abwaschen mit 50-%igem Äthanol (30 Sekunden) und Aqua dest. (2 Minuten) entfernt. Die Sudan-III-Lösung wird durch Lösen von 0,3 g Farbstoff in 100 ml 70-%igem Äthanol hergestellt. Der Lösungsvorgang dauert bei 37° C etwa 24 Stunden. Nach dem Filtrieren werden der Lösung 15 ml Aqua dest. zugesetzt. Die Übersichtspräparate werden mit Haemalaun nach P. MAYER (Fa. Merck) gegengefärbt. (8 Minuten mit Farblösung überschichten; kurz bläuen in lauwarmem Wasser.)

Sudanschwarz-B-Färbung nach LISON (zitiert nach ADAM und CZIHAK (2)): Die gesättigte Farblösung erhält man durch Auflösen von 0,1 g Sudanschwarz B in 70-%igem Äthanol. Die Lösung wird kurz im Rückflußkühler gekocht und anschließend filtriert. Die Färbedauer beträgt 5 - 30 Minuten, danach wird mit Aqua dest. gespült. Die Übersichtspräparate werden mit Kernechtrot-Lösung 5 Minuten gegengefärbt und mit Aqua dest. 5 Minuten gewässert.

Kernechtrot-Lösung: 0,1 g Kernechtrot werden in 100 ml 5-%iger wässriger Aluminumsulfat-Lösung bis zum Aufkochen erhitzt. Die Lösung wird nach dem Erkalten filtriert.

Sudanschwarz-B-Färbung nach SHEEHAN und STOREY (54): Formoldampf-fixierte Präparate werden 20 - 35 Minuten gefärbt; 10 Minuten in 70-%igem Äthanol ausgewaschen und differenziert. Die Farblösung wird jeweils frisch aus Sudan-Lösung und Puffer-Lösung (6.: 4) hergestellt und vor dem Gebrauch in einer Saugnutsche filtriert. Die Sudan-Lösung wird durch Auflösen von 0,3 g Sudanschwarz B in 100 cm³ absolutem Methanol (die Originalmethode verwendet Äthanol, wir benutzen - einem Vorschlag HERMAN'SKY's folgend - Methanol) binnen 24 Stunden bei 37° C hergestellt. Die Puffer-Lösung entsteht durch Zusammen gießen von 100 ml einer 0,3-%igen Na₂HPO₄ x 12 H₂O-Lösung in Aqua dest. und einer Lösung von 16 g kristallinem Phenol in 30 cm³ absolutem Äthanol. Das pH der Puffer-Lösung wird durch Zufügen einer Spur 1/10 normaler Natronlauge auf 7,4 eingestellt. Die Gegenfärbung von Übersichtspräparaten erfolgt mit Giemsa-Lösung oder mit Kernechtrot.

Farbstoffelution: Einige Sudanschwarz-B- (nach SHEEHAN und STOREY) gefärbte Präparate werden in Äthanol und Methanol verschieden lange eluiert, um die Reversibilität der Färbung zu untersuchen. Der Farbstoff wirkt unterschiedlich lange (5 - 35 Minuten) ein.

Löslichkeitsverhalten: Das Löslichkeitsverhalten muß, wie bei CLARA (15) erläutert, an unfixiertem Material untersucht werden. Lufttrockene Präparate werden bei 37° C für 5, 10, 20 und 60 Minuten sowie für 6 und 24 Stunden in Äther, Äthanol und Methanol aufbewahrt. Es werden nach den genannten Zeiten jeweils 2 Präparate entnommen, von denen das eine sofort im Phasenkontrast-Mikroskop betrachtet, und das andere nach Formoldampf-Fixation mit Sudanschwarz B (nach SHEEHAN und STOREY) gefärbt und im Hellfeld untersucht wird.

In allen Fällen werden die erhaltenen Übersichtspräparate im Hellfeld bzw. phasenoptisch meanderförmig durchmustert und nach Glanzkörnern bzw. glanzkornartigen gefärbten Strukturen durchsucht.

3 b. Untersuchung von Färbung und Löslichkeitsverhalten der Glanzkörner unter optischer Kontrolle:

Zum Ausschluß von Verwechslungen der Glanzkörner mit ähnlichen Granula werden Verfahren entwickelt, die ein eindeutiges Wiederauffinden phasenkontrastmikroskopisch erkannter Glanzkörner nach Färbung und Löslichkeitsversuchen gestatten.

In einer von RIND und OTTO (47) angegebenen Methode wird supravitales Material unter einem Deckglas im Phasenkontrast durchsucht. Fragliche Stellen werden dadurch wiedergefunden, daß der Objektisch arretiert wird und die Farblösung nach vorsichtigem Anheben einer Deckglaskante mit einer Rasierklinge mittels Fließpapier in das Präparat gesaugt wird. Aus diesem Ansatz entsteht unsere Methode.

Wir durchsuchen fixierte (bei Löslichkeitsversuchen entsprechend lufttrockene) Präparate, indem wir ein Deckglas auflegen, wobei u.U. zur "Immersion" ein Tropfen physiologischer Salzlösung auf das Objekt gegeben wird. Nach Auffinden eines Glanzkornes wird der Kreutztisch arretiert, die Optik wird weggedreht und das Deckglas entfernt. Nun wird ein kleiner, beidseits offener Glaszylinder, den wir von einem Reagenzglas abhägten, auf die betrachtete Stelle gesetzt und sein Unterrand auf dem Objektträger wird mit Knetgummi abgedichtet. In diesen Zylinder können Farbstoffe und Lösungsmittel eingefüllt werden.

Die Beobachtung der Einwirkung mehrerer Reagenzien nacheinander ist möglich, wenn jeweils das vorhergehende mit dem nachfolgenden durch mehrfaches Füllen und Entleeren des Zylinders mit einer Pasteurpipette ausgewaschen wird. Auf diese Weise nehmen wir an Glanzkörnern verschiedener Zellen Färberversuche mit der Pappenheim'schen Methode, mit Sudan III, mit Sudanschwarz B nach LISON und mit Sudanschwarz B nach SHEEHAN und STOREY sowie Löslichkeitsuntersuchungen und Farbstoffextraktionsversuche vor.

Durch Übung gelingt zuletzt mit der Sudanschwarz-B-Färbung nach SHEEHAN und STOREY eine vereinfachte Technik: Das Präpa-

rat wird mit einem Tropfen Farblösung bedeckt, ein Deckglas aufgelegt und im Phasenkontrast eine glanzkornhaltige Zelle gesucht. Diese Manipulationen dauern in günstigen Fällen etwa 20 Sekunden, Glanzkörner sind zu diesem Zeitpunkt noch phasenoptisch an ihrer zentralen Aufhellung erkennbar. Sobald ein Glanzkorn gefunden ist, wird der Kreutztisch arretiert und der Deckglasrand paraffiniert. Die sichtbaren Veränderungen bei fortschreitender Färbung können nun beobachtet werden.

c) Optische Hilfsmittel und Dokumentation

Zur Auswertung der Supravitalfärbung mit Janusgrün benutzen wir ein Ortholux-Mikroskop der Fa. Leitz mit Immersionsoptik (Öl 95/1,32); die Dokumentation erfolgt mit der dazugehörigen automatischen Kamera Orthomat auf Agfa-Farbfilm-Material. Für die Lebendbeobachtung, die Successivbeobachtung mit verschiedenen optischen Verfahren und die Phasenkontrastkontrolle stellen wir aus passenden Bauelementen der Fa. Carl Zeiss ein Mikroskop zusammen. Wir benutzen dazu das Stativ Standard WL mit rundem, dreh- und zentrierbarem Kreutztisch und fester 6 Volt, 15 Watt Lichtquelle mit Grünfilter; Kondensor ist der achromatisch-aplanatische Hellfeld-Phasenkontrast-Dunkelfeld-Kondensor VZ; die wesentlichen Objektive sind zwei angepaßte Neofluare (Öl 100/1,30), von denen das eine für den positiven Phasenkontrast eingerichtet ist; das zweite ist spannungsfrei und eignet sich für Polarisationsbestimmung und Hellfeldmikroskopie. Über dem Objektrevolver wird ein Zwischenstück angebracht, das durch Einschalten von Prismen die teilweise oder völlige Umlenkung des Bildes in zwei verschiedene Richtungen ermöglicht. Seitlich am Zwischenstück befindet sich ein Bino-kulartubus (2 Kpl 12-fache Okulare); auf das Zwischenstück ist ein gerader Tubus mit einem passenden Kompensationsokular (8-fach) aufgesetzt.

Zur Polarisationskontrolle wird eine Einrichtung der Fa. Zeiss Opton verwandt. Bei Hellfeld-Einstellung wird der Pola-

risator in den Filterträger des Kondensors eingelegt, die Umlenkprismen des Zwischenstückes werden aus dem Strahlengang genommen, und auf das Kpl-Okular des O-Tubus wird der Kompensator Rot I und der Analysator frei drehbar aufgelegt.

Ein angenähertes Dunkelfeld erhalten wir nach Einstellen des Kondensors auf Dunkelfeldbeobachtung bei Einschaltung des Phasenobjektives ohne Abblendung des Objektives. Für das Dunkelfeld muß Immersionsöl zwischen Kondensorfrontlinse und Objektträger gebracht werden; da dies die anderen Beobachtungsverfahren nicht stört, wird die Immersion am Beginn aller Lebendbeobachtungen hergestellt. Zur Dokumentation wird auf das Kpl-Okular des O-Tubus ein Grundkörper I in Verbindung mit einem Leicachassis aufgesetzt. Filmmaterial ist AGePe-Dokumentenfilm 10/10⁰ DIN. Die Belichtung wird mit Probelichtstreifen ermittelt und beträgt für das Hellfeld 3 - 5 Sekunden, für den Phasenkontrast 45 - 60 Sekunden. Die Endvergrößerung der Photos ermitteln wir durch Abbildung eines Meßobjektträgers.



Abb. 1: Aufbau unseres Beobachtungsmikroskopes
(Einzelheiten siehe Text)

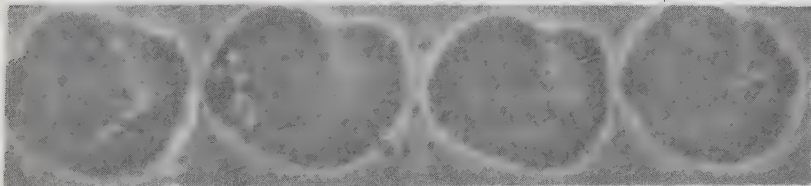
IV. Ergebnisse:

Zu 1.: Lebendbeobachtung und optisches Verhalten

Bei Betrachtung im positiven Phasenkontrast finden wir Glanzkörner in

1. Lymphocyten, Plasmazellen, Monocyten
2. Phytozellen,
3. Myeloblasten, Promyelocyten, Myelocyten
Stabkernigen, Segmentkernigen und eosinophilen Granulocyten,
4. Proerythroblasten, basophilen und polychromatischen Erythroblasten.

In lebendfrischem Knochenmark sind diese Varia selten, bei sorgfältigem Durchmustern von etwa 500 Präparaten stellen wir sie zwar in allen der aufgeführten Zellen fest, ihre Häufigkeit ist jedoch gering. Mit fortschreitender Kultivierung nimmt die Zahl der glanzkornhaltigen Zellen anscheinend zu; wir beobachten sie nach 24 Stunden und vor allem nach 48 Stunden häufiger und bemerken dabei teilweise Zellen, die weit über 10 Glanzkörner haben; ähnliches sehen wir in "Originalen" nie. Die zeitliche Abhängigkeit zwischen Vermehrung der Glanzkörner und Inkubationsdauer ist damit augenscheinlich. Für die Phytohaemagglutinin-stimulierten Lymphocyten gibt es keinen entsprechenden Vergleichswert, da sich die blastenartigen Zellen erst während der Kultivierung entwickeln; ausreichend oft finden wir hier Glanzkörner blastenartiger Zellen nach 48-stündiger Inkubation. Bemerkenswert erscheint die besonders große Zunahme glanzkornhaltiger Zellen in den sog. "platten Präparaten".



24 h 24,5 h 43 h 46 h
Abb. 2: Zunahme und Rückbildung von Glanzkörnern in einem Erythroblasten. Die Glanzkörner sind phasenpositive (dunkle) Granula mit zentraler Aufhellung (Pfeile); die hellen Granula sind Vacuolen. (Lebendbeobachtung im platten Präparat. Beobachtungsdauer in Kulturstunden)

10 μ

Eine empirische Aussage über die Häufigkeit des Glanzkorn-Phänomens in verschiedenen Zellformen ist schwierig, die unterschiedlichen Zellrelationen täuschen sehr. Trotz dieser Einschränkung haben wir den Eindruck, daß sie allgemein in den Zellen der roten Reihe seltener sind als in den anderen beschriebenen Zellen. Vergleiche der Häufigkeit in den einzelnen Reifungsstufen sind uns empirisch nicht möglich, da einerseits die Zahl glanzkornhaltiger Zellen bei Kultivierung zunimmt, andererseits die Zahl jugendlicher Zellen ständig kleiner wird. Obwohl, wie wir unseren Beobachtungen entnehmen dürfen, die Glanzkörner anscheinend bei der Kultivierung entstehen müssen, sehen wir den Entstehungsmoment eines Glanzkornes kaum. Sie erscheinen sehr plötzlich. Genau wie BOLL bemerken wir aber in den granulaärmeren Zellarten vor dem Auftreten von Glanzkörnern anscheinend größer werdende, tiefschwarze, runde Granula. Die Zahl dieser Granula nimmt in glanzkornreichen Zellen wieder ab.

Eine feste Beziehung zwischen Glanzkornentstehung und Oberflächenaktivität der Zelle besteht nicht. Beide Phänomene kommen zwar - wie BOLL (10) an Plasmocytomzellen beobachtet - gleichzeitig vor, doch sehen wir sie auch isoliert jedes für sich. In seltenen Fällen beobachten wir die Rückbildung bereits entstandener Glanzkörner; diese Rückbildung bemerken wir nie bei erkennbar abgestorbenen Zellen, sondern nur in anscheinend (nach Kernstruktur und Granulabewegung) lebenden Zellen. Feste Beziehungen zwischen Rückbildung und Mitoseaktivität (wie sie BOLL vermutbar macht) fallen nicht auf. Teilweise bestehen die Glanzkörner weiter, manchmal werden sie auch zurückgebildet, jedoch könnte die Rückbildung bei Mitosen häufiger sein. Die Seltenheit der Beobachtungen erlaubt aber keine bindenden Schlüsse.

Abgesehen von pathologischen Zellvermehrungen, wobei wir häufiger glanzkornhaltige Zellen der betroffenen Zellart finden, sind zwischen Glanzkornbildungen in Kulturzellen und Erkrankung des Gesamt-Organismus Zusammenhänge empirisch nicht bemerkbar.

Glanzkörner sind beweglich, ihre Bewegung läßt sich mit der Granulabewegung in Granulocyten vergleichen. Die Beweglichkeit ist unterschiedlich und abhängig von Bewegungen der ganzen Zellen. Das vorangehend beschriebene Verhalten der Glanzkörner in

kultivierten Zellen bezieht sich nicht nur auf das im Abschnitt "Material und Methode" beschriebene Patientengut, sondern ist empirisches Ergebnis der Lebendbeobachtung von 423 Knochenmarkszellen (aus den anfallenden Sternalpunktaten der Klinik) und 18 Phytohaemagglutin-stimulierten Lymphocyten. Von diesen entwickeln 126 Knochenmarkszellen - davon 2 in Mitose - und 12 stimulierte Lymphocyten - von denen einer eine Zellteilung beginnt - Glanzkörper. Die Kultivierungszeit beträgt zwischen 6 und 48 Stunden, die Beobachtungen dauern 3 bis 76 Stunden. Bei einer Aufteilung auf das Patientengut und die Zellart ist dieses Material für eine statistische Auswertung zu gering. Derzeit vorgenommene eingehende Untersuchungen scheinen unsere empirischen Aussagen zu bestätigen.

An relativ bewegungsärmeren Glanzkörpern in Lymphocyten, Plasmazellen, Monocyten, Promyelocyten, Myelocyten, Granulocyten, Proerythroblasten, basophilen und polychromatischen Erythroblasten überprüfen wir die optischen Eigenschaften, die sich für alle Zellen gleich erweisen:

Der zentrale Glanz im positiven Phasenkontrast ist nur sichtbar, solange die Glanzkörper in der scharf eingestellten Objektebene liegen, ober- und unterhalb dieser Ebene erscheinen sie meist dunkel, manchmal auch hell. Im Hellfeld beobachten wir Ähnliches. Glanzkörper erscheinen meist hell; häufig heben sie sich von der Umgebung nicht ab und sind daher kaum erkennbar; bei Wechsel der Fokussierung können sie auch dunkel werden. Im Dunkelfeld leuchten die Glanzkörper hell auf. Im polarisierten Licht sind Glanzkörper nicht sichtbar; sie sind optisch anisotrop.

Zu 2: Supravitalfärbung mit Janusgrün B

Das lichtmikroskopische Bild ist wenig kontrastreich, exakte Aussagen sind nur über Form und Größe von Kern und Zelle (Kern-Plasma-Relation) möglich; je nach Zellart können Bewegungsformen und schattenhafte Granula gesehen werden; manchmal erkennt man auch Binnenstrukturen der Kerne, die formal Nukleolen sein können.

Vereinzelte haben die Kerne und ein Teil der Granulationen bei der Janusgrün-Färbung einen blaß-lila-rötlichen Schimmer ange-

nommen. Als spezifischen Effekt der Färbung sehen wir blau-grüne, runde bis fadenförmige, kleine Granula und durchscheinende blau-grüne, scharf begrenzte, runde $1/2$ bis 2μ große, mehr oder minder bewegliche Korpuskeln. Aufgrund der morphologischen Charakteristika und der empirischen Häufigkeiten in den Zellen nach der Inkubation halten wir diese für angefärbte Glanzkörner (dazu siehe auch die Diskussion).

Nach den aufgeführten Kriterien lassen sich unter den Zellen, in denen wir Glanzkörner mit Janusgrün blau-grün darstellen können, folgende Zellarten unterscheiden:

Lymphocyten, Plasmazellen, Monocyten, Phytozellen,
Myeloblasten, Promyelocyten, Myelocyten, eosinophile
Myelocyten,
stabkernige, segmentkernige, eosinophile Granulocyten,
Proerythroblasten, basophile, polychromatische Erythro-
blasten

und

Megacaryocyten.

Beim Durchmustern von 44 Präparaten - 8 Knochenmarkkulturen und 3 Phytozellkulturen, je 2 Präparate nach 24 und 48 Stunden (s.o.) - finden wir überaus reichliches Material, dem wir die nachfolgenden Photographien entnehmen:

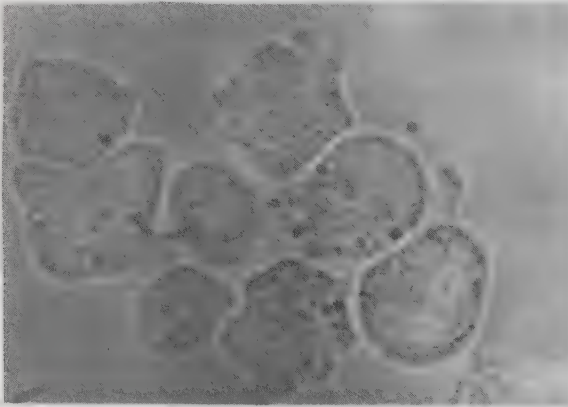


Abb. 3: Mit Janusgrün B gefärbte Zellgruppe aus einer 24 Stunden alten Knochenmarkkultur: 2 Lymphocyten, 4 segmentkernige Granulocyten, rechts unten ein Myelocyt und schräg darüber ein Promyelocyt.

10 μ

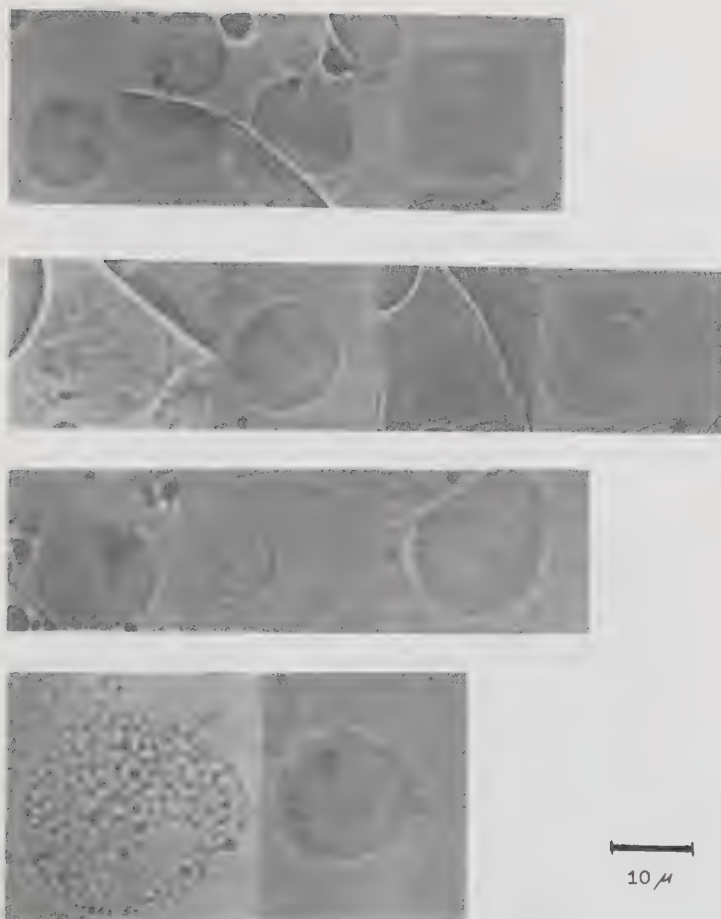


Abb. 4: In inkubierten Lymphocyten (a + b), Plasmazellen (b), Monocyten (c), Proerythroblasten (d), basophilen (e + g) und polychromatischen (f) Erythroblasten, in Myeloblasten (h), Promyelocyten (i) und Myelocyten (j) sowie in Megacaryocyten (k) und Phytozellen (l) sind mit Janusgrün B neben den Mitochondrien auch Glanzkörper darstellbar. (Schwarz-weiß-Abzüge von Farbphotographien; die dunkelgrauen bis schwarzen Granula sind blau-grün, Cytoplasma und Kern sind farblos oder leicht rot-violett getönt.)

Zu 3: Fixierung, Färbung und Löslichkeitsverhalten

Unsere Beobachtungstechniken - die Untersuchung des färbischen und Löslichkeitsverhaltens der Glanzkörner in Übersichtspräparaten und die Beobachtung der Einwirkung von Farbstoffen und Lösungsmitteln auf phasenkontrastmikroskopisch diagnostizierte Glanzkörner - dienen der Aufklärung der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Glanzkornsubstanz. Die beiden Verfahren ergänzen einander in ihrer Aussage, indem das eine in einfacher Weise ein bestimmtes Verhalten der Glanzkörner in möglichst vielen Zellen aufdeckt, wobei die Beurteilung der Ergebnisse durch die Möglichkeit von Verwechslungen der Glanzkörner mit anderen gleich großen, runden Granula erschwert wird, während das andere, durch zeitraubende, umständliche und nicht immer erfolgreiche Manipulationen den präzisen Nachweis dieses Verhaltens für ein sicher erkanntes Glanzkorn ermöglicht. Wir führen unsere 5 Färbemethoden und die 3 Löslichkeitsuntersuchungen für alle oben angegebenen Fälle je dreimal an Präparaten der 24 und 48-Stundenkultur durch und erhalten damit 528 Übersichtspräparate. Phasenkontrastkontrollen sind 42 x erfolgreich bei 60 Versuchen.

Da wir auf diesen beiden Wegen zu den gleichen Aussagen kommen, wobei einmal die Vielfalt glanzkornhaltiger Zellen erfaßt und zum anderen absolute Sicherheit des Ergebnisses erzielt wird, lassen sich die Einzelbeobachtungen in der folgenden Tabelle zusammenfassen. Wir führen in dieser Tabelle den positiven Ausgang einer Reaktion symbolisiert durch ein + auf, negative Testergebnisse werden durch - symbolisiert, für fehlende Beobachtungen bleiben freie Räume. Die mittels Phasenkontrast-Kontrolle überprüften Ergebnisse werden durch Umkreisung hervorgehoben. Entsprechend der Seltenheit mancher Zellen können an ihnen nicht alle Untersuchungsergebnisse ermittelt werden; teilweise mißlingen die "Phasenkontrast-Kontrollen" wegen technischer Schwierigkeiten. Dadurch werden unsere Beobachtungen lückenhaft. Bei der "Konvergenz" der Einzelergebnisse scheinen uns derartige Lücken vertretbar, zumal der Aufwand, der nötig ist, sie zu schließen, im Verhältnis zum voraussehbaren Zuwachs an wesentlicher Information zu groß ist.

Zellart	Darstellbarkeit von Glanzkörnern			Löslichkeit d. Glanzkornsubstanz		
	panchromatisch	Osmium-tetroxyd	Sudan III	Sudan-schwarz (LISON)	Sudan-schwarz (SH.u.ST.) Äther	nach 60 Min. Äther nach 10 Min. Methanol
Lymphocyten	-	+	⊖	⊖	⊖	+
Plasmazellen	⊖	+	-	⊖	⊖	⊕
Monocyten	-	+	-	-	-	⊕
Phytoblasten	⊖	+	-	-	-	+
Megacaryocyten	-		-	-	-	+
Myeloblasten	-			⊕	⊕	+
Promyelocyten	⊖	+	⊖	⊖	⊖	⊕
Myelocyten	-		-	⊕	⊕	+
eosin. Myelocyten	-	+		⊕	⊕	+
stark. Granulocyten	-	+	-	-	-	⊕
neutr. Granulocyten	⊖	+	-	⊖	-	⊕
eosin. Granulocyten	-	+		⊕	⊕	+
Proerythroblasten	⊖	+	-	-	-	+
bas. Erythroblasten	-	+	⊖	-	-	⊕
poly. Erythroblasten	⊖	+	⊖	⊖	-	⊕

Tabelle 1:

Übersicht über das färberische und Löslichkeitsverhalten von Glanzkörnern in verschiedenen Knochenmarkkulturzellen und PHA-stimulierten Lymphocyten (Phasenkontrastkontrollen umkreist)

Diese Übersicht zeigt, daß das physikalisch-chemische Verhalten der Glanzkörner in allen beobachteten Zellen gleich ist. Wir beschreiben daher die Einwirkung der verschiedenen Agentien summarisch:

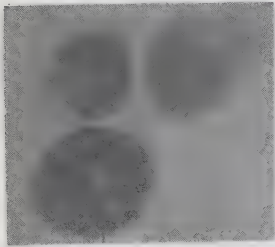
Osmiumtetroxyd führt zu einer Schwärzung. Die Kontrolle der Einwirkung im Phasenkontrast ist wegen der Besonderheit der Applikation (als Dampf) nicht möglich. Da die Schwärzung mannigfache Strukturelemente in Kern und Plasma umfaßt, ist es in granularen Zellen nicht leicht zu entscheiden, welche der angefärbten Granula Glanzkörner sind, denn einziges Kriterium ist hier Form und Größe. Ersichtlich wird der spezifische Effekt des Osmiumtetroxyds auf die Glanzkörner, wenn Originale mit Kulturpräparaten verglichen werden, da in letzteren glanzkorngroße, runde Granula (entsprechend der erhöhten Häufigkeit nach Inkubation) eindeutig vermehrt gesehen werden.

Die panchromatische Färbung nach PAPPENHEIM stellt Glanzkörner nicht dar. Teilweise sehen wir in Form und Größe nicht immer adäquate leere Räume in den Zellen, die wir als Standorte der durch das absolute Methanol (MAY-GRÜNWARD !) herausgelösten Glanzkörner ansehen. Diese freien ungefärbten Bezirke sind aber nicht obligatorisches Ergebnis der Färbung. In den phasenkontrastkontrollierten Präparaten gelingt zwar der Nachweis der Nichtfärbbarkeit, größere zurückbleibende leere Stellen finden wir jedoch in unseren Beobachtungen hierbei nicht.

Sudan III färbt Glanzkörner nicht an. Obwohl wir rotgefärbte Vakuolen verschiedener Größe darstellen können, sind wir hierin völlig sicher, denn es gelingt uns nicht nur der Nachweis dieses Verhaltens für mehrere Zellarten mittels Phasenkontrast-Kontrolle, sondern einige Male auch die Beobachtung phasenoptisch erkennbarer ungefärbter Glanzkörner nach der Einwirkung des Farbstoffes.

Mit Sudanschwarz B (nach LISON) erhalten wir schwieriger deutbare Ergebnisse. Stärkere Schwärzungen von Glanzkörnern, die für den positiven Ausfall der Färbung sprechen würden, erhalten wir nie, aber auch in den Kontrollen haben wir mehrfach den Eindruck, daß sich die Ränder größerer Glanzkörner zart grau anfärben. Diese "Tönung" ist allerdings so schwach und kontrastarm, daß sie in angefertigten Photographien nicht mehr nachweisbar ist.

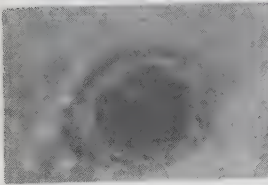
Deutlich positive Ergebnisse zeigen sich nur mit Sudan-schwarz B nach SHEEHAN und STOREY. Die Glanzkörner werden dabei tief schwarz. Der eindeutige Nachweis dieses Verhaltens kann für alle beobachteten Zellarten erbracht werden und wird in allen Fällen mit der Phasenkontrast-Kontrolle belegt. Wir zeigen diese Ergebnisse für einige Zellarten:



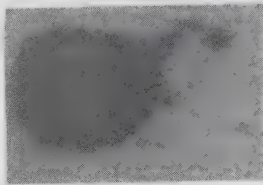
a) 2-kernige Plasmazelle (unten)
2 polychromatische Erythroblasten (oben)
(SSB; Haemalaun)



b) Monoblast (nur SSB)
(x = Artefakt; extrazellulär)



c) Myeloblast mit vielen Glanzkörnern
(SSB; Haemalaun)



d) Phytozelle
(SSB; Giemsa)

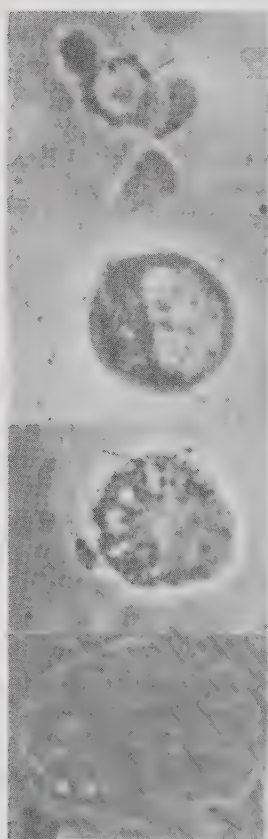
Abb 5: Sudanschwarz-B-positive Glanzkörner (Pfeil) in kultivierten Zellen

10 μ

SUCCESSIVDARSTELLUNG VON GLANZKÖRNERN

Phasenkontrast

SSB-Färbung



a)

reifer Erythro-
blast
(Blisterform)

b)

Promyelocyt

c)

Myelocyt

d)

Megacaryocyt

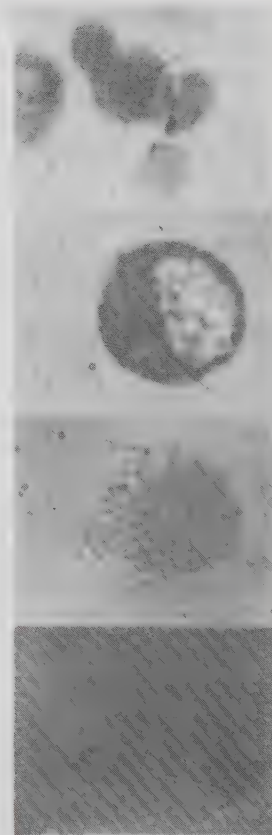


Abb. 6: Phasenkontrastmikroskopische Bilder glanzkornhaltiger Zellen sind den Abbildungen der gleichen Zellen nach Sudanschwarz-B-Färbung gegenübergestellt. Dadurch kann der eindeutige Nachweis, daß Glanzkörner mit Sudanschwarz B anfärbbar sind, auch in granulareichen Zellen erbracht werden. Die Glanzkörner sind durch Pfeile markiert.

10 μ

Die Eluierbarkeit des Farbstoffs wird eingehend untersucht, und es zeigt sich, daß die Färbung an sich reversibel ist, daß sowohl mit Äthanol als auch mit Methanol der Farbstoff zu jedem Zeitpunkt der Färbung aus den Glanzkörnern herausgelöst werden kann, daß aber mit fortschreitender Färbung die hierzu nötigen Zeiten unverhältnismäßig verlängert werden. Nach 5-minütiger Färbung ist der Farbstoff durch 5- bis 10-minütige Elution ohne weiteres herauszulösen, nach einer Einwirkung über 10 Minuten wird die Herauslösbarkeit zunehmend verschlechtert bzw. dauert länger und gelingt auch bei ständiger Erneuerung des Lösungsmittels erst nach 6 - 24 Stunden. Es erfolgt also zunächst eine fortschreitende, leicht reversible Lösung des Sudan in den Granulastrukturen, von einer bestimmten Einwirkungszeit an - zwischen 10 und 20 Minuten - besteht noch eine Eluierbarkeit, jedoch ist diese zeitlich so verzögert, daß es sich nicht einfach um eine Auswaschung des in der Struktur gelösten Sudan handeln kann. Die Deutung dieser Beobachtung wird zu diskutieren sein.

Da sich das Löslichkeitsverhalten durch Einwirkung fixierender Agentien ändern könnte, untersuchen wir die Einwirkung der bekannten organischen Lösungsmittel Äther, Methanol und Äthanol an unfixierten angetrockneten (20 Minuten nach dem Ausstreichen) Präparaten:

Bei phasenkontrastmikroskopischer Nachuntersuchung der verschieden lange eluierten Präparate finden wir nach absolutem Methanol und absolutem Äthanol bereits innerhalb von 5 Minuten keine Glanzkörner mehr, während bei Ätherextraktion noch nach 60 Minuten eindeutig Glanzkörner zu sehen sind.

Die Beurteilung der mit Sudanschwarz B nach SHEEHAN und STOREY nachgefärbten Präparate nach einer Elution mit Äthanol, Methanol und Äther ist u.U. problematisch, da sich nach Äthanol- und Methanol-Einwirkung noch nach 20 Minuten (und später) glanzkorngroße runde Granula feststellen lassen; bemerkenswerterweise sind bei Ätherbehandlung selbst nach 24 Stunden noch derartige Strukturen zu beobachten. Dieses dif-

ferente Verhalten der Glanzkornstruktur, die leichte Lösbarkeit in Äthanol oder Methanol und die schlechte Eluierbarkeit mit Äther kann an verschiedenen Zellarten mit der Phasenkontrast-Kontrolle nachgewiesen werden und bedarf eingehender Diskussion.

LÖSLICHKEITSVERSUCHE

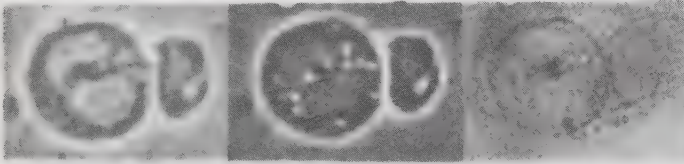


Abb. 8: Phasenkontrastabbildung eines Erythroblasten mit "kleinen" Glanzkörnern (Phase)

nach 10 Min. absolutes Äthanol

nachgefärbt mit Sudanschwarz B

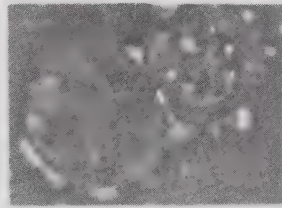
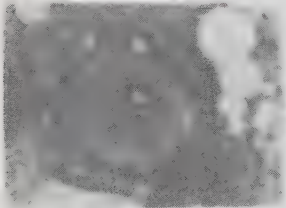


Abb. 9: Promyelocyt 10 Min. abs. Methanol; nachgefärbt mit SSB (x = extrazellulär)

Abb. 10: Promyelocyt u. Myelocyt 60 Min. Ätherextraktion; nachgefärbt mit SSB beachte: die großen Granula sind nur teilweise eluiert

FARBSTOFFELUTION (24 h absolutes Methanol)

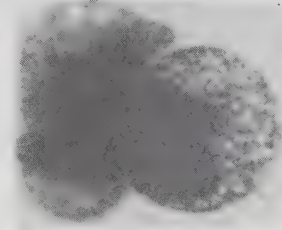
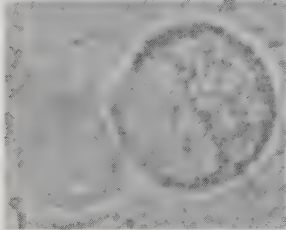


Abb. 11: Der SSB-gefärbte Promyelocyt hat nach 24 h Elution noch schwarze Granula (Nachfärbung mit Giemsa)

10 μ

V. Diskussion der angewandten Methode und ihre Aussagekraft über Glanzkörner:

Wesentliches unmittelbares Ergebnis unserer Arbeit ist die Beobachtung, daß Glanzkörner in allen untersuchten Zellarten auftreten können und daß sie unabhängig von der Zellart in allen betrachteten Eigenschaften gleich sind. Folglich sind Glanzkörner variabel auftretende Zellbestandteile, deren zentraler Glanz nicht zufällig gemeinsames Eoiphanomen unterschiedlicher Strukturen, sondern Erkennungszeichen und Ausdruck morphologischer Identität ist; sie sind keine zellspezifischen Varia, wie WENNIG das für die Lymphocyten-Glankörner annimmt (zellspezifisch ist allenfalls die signifikante Abhängigkeit des Glanzkornwertes vom Lipoperoxydspiegel), sondern sie können in verschiedenen Zellen, zumindest in allen untersuchten haematopoetischen Zellen auftreten.

Bau und Bedeutung dieser zellunspezifischen, morphologisch einheitlichen Varia sind aus unseren Untersuchungen erschließbar. Dazu sollen unsere Einzelergebnisse unter zwei Gesichtspunkten diskutiert werden:

1. Wie sind die physikalischen und färberischen Eigenschaften der Glanzkörner zu deuten ?
2. Wie sind die Glanzkörner der Kulturzellen biologisch aufzufassen ?

Zu 1.: Die optischen Untersuchungen sagen wenig über die Struktur der Glanzkörner aus. Das Hellfeld liefert in erster Linie vergrößerte Abbilder von "Amplitudenobjekten"; es gestattet Aussagen über Form, Größe, Lichtabsorption und liefert Hinweise auf den Brechungsindex, da kleinere, stärker lichtbrechende Objektdetails aufgeheilt werden. Glanzkörner sind runde, gut begrenzte, zwischen $1/2$ und 2μ große Granula, deren Helligkeit demnach den Schluß auf geringe Absorption und höheren

Brechungsindex erlaubt.

Das Dunkelfeld dient in erster Linie dem Nachweis von Strukturen an der unteren Grenze des Auflösungsvermögens. Da hierbei Lichtstrahlen mit sehr flachem Einfallswinkel auf das Objekt treffen, kann die Helligkeit der Glanzkörner bei dieser Betrachtungsweise ein weiterer Hinweis auf einen höheren Brechungsindex sein, denn nur höher lichtbrechende Objekte können die Lichtstrahlen in den Aperturwinkel des Objektives brechen.

Im polarisierten Licht bleiben nur Strukturen sichtbar, die die Schwingungsebene des elektromagnetischen Lichtfeldes beeinflussen. Optische Isotropie ist gebunden an gerichtete räumliche Orientierung der submikroskopischen Struktur (Form und Eigendoppelbrechung). Da die Glanzkörner anisotrop sind, können wir schließen, daß sie weder optisch aktive Substanzen enthalten noch eine besondere makromolekulare oder mizellare Struktur im Sinne bestimmter räumlicher Ordnung besitzen.

Das Aufleuchten der Glanzkornzentren bei Betrachtung im positiven Phasenkontrast ist zwar kennzeichnend, doch erlaubt dieses Phänomen kaum Rückschlüsse auf die Eigenschaften der Glanzkörner; isoliert von anderen Beobachtungen können wir es nicht einmal eindeutig interpretieren. Die unterschiedliche Helligkeit von Zentrum und Randwall kann Folge einer "Doppelstruktur" im Sinne eines Bauunterschiedes zwischen beiden Bezirken sein. Ein Beispiel hierfür sind die eosinophilen Granula, die im positiven Phasenkontrast eine zentrale Aufhellung zeigen, der elektronenmikroskopisch eine zentrale Kristallisation (BESSIS (5)) entspricht. Dieser Bauunterschied drückt sich auch in der Sudanschwarz-Färbung nach SHEEHAN und STOREY der eosinophilen Granula aus. durch eine geringere Schwärzung der Zentren⁺.

⁺ Nach der Theorie der lysochromen Fettfärbung (s.u.) könnte die schlechte Färbbarkeit des Zentrums unmittelbare Folge der veränderten Lösungsmittleigenschaften durch die kristalline Phase sein.

Elektronenmikroskopisch erscheinen die Glanzkörner nach Abbildungen eines Lymphocyten-Glanzkornes bei BESSIS (5) homogen dunkel; in elektronenmikroskopischen Abbildungen von Phytoblasten bei ELVES u.a. (19) sind glanzkorngroße Granula ebenfalls homogen; bei LAZARUS u. Mitarb. (29) sind ebenfalls Phytoblasten abgebildet, die homogen lamellär gebaute osmiophile Einschlüsse mit einem schmalen, etwa 70 Angström großen hellen Randsaum zeigen und nach Form und Größe Glanzkörner sein könnten. In unseren Sudanschwarz-B-gefärbten Präparaten (nach SHEEHAN und STOREY) sind die Glanzkörner im Gegensatz zu den eosinophilen Granula homogen geschwärzt. Sie scheinen also keine, den eosinophilen Granula ähnliche Doppelstruktur zu besitzen bzw. es finden sich keine Hinweise darauf, und wir neigen daher der folgenden Interpretation des Glanzkornphänomens als Inversionerscheinung zu. Inversionen - Umkehrungen eines positiven Bildkontrastes in einen negativen, hellen Kontrast - entstehen im Phasenkontrastmikroskop als Folge der Abbildungsbedingungen bei bestimmten Objektstrukturen. Inversionen sind primär abhängig von der Konstruktion des Mikroskopes und erst sekundär objektbedingt. Ohne auf Einzelheiten einzugehen sei hier hervorgehoben, daß das Phasenkontrastbild wesentlich durch zwei Eingriffe in den Strahlengang zustande kommt:

Eine Abblendung der Lichtquelle im Kondensor.

Eine Beeinflussung des Lichtes in der Abbildungsebene der Lichtquelle.

Die Abbildung der Lichtquelle erfolgt bei parallelem Strahlengang in der hinteren Brennebene des Objektivs. Dort befindet sich im Phasenkontrastmikroskop ein der Abbildungsfigur der abgeblendeten Lichtquelle kongruentes Phasenplättchen, das die Phase des durchfallenden Lichtes um $\pi/2$ verschiebt und einen Teil seiner Schwingungsenergie (ungefähr 70 %) absorbiert. Vom Objekt entsteht in dieser Ebene ein Beugungsbild, das "primäre Zwischenbild", wobei die Beugungsmaxima aufgrund des parallelen

Strahlenganges in das Phasenplättchen fallen müssen. Die betrachtbare Abbildung des Objektes ist ein Interferenzbild dieses primären Zwischenbildes. Im positiven Phasenkontrast werden bei Interferenz der phasenverschobenen und durch teilweise Absorption amplitudenverminderten Beugungsmaxima mit den Beugungsbildern höherer Ordnung die Bildpunkte der stärker brechenden Objektstrukturen in der Regel abgedunkelt, sie ergeben positiven Bildkontrast. Diese Regel gilt nur bis zu einem Grenzwert der Phasenverschiebung durch das Objekt. Stärker phasenverschiebende Objektstrukturen erscheinen nicht abgedunkelt, sondern heller als ihre Umgebung, was als Inversion bezeichnet wird.

Daß die Glanzkörner stark lichtbrechend sind, geht bereits aus ihren Abbildungen im Hellfeld und im Dunkelfeld hervor. Die Phasenverschiebung durch das Objekt hängt ab von der optischen Dichte und vom Lichtweg, also von der Dicke der Objektstruktur. Da die Glanzkörner offensichtlich Kugeln sind, ist es leicht vorstellbar, daß das Zentrum den oben angedeuteten Grenzwert der Phasenverschiebung übersteigt und aufgehellert wird, während die Peripherie, weil der Lichtweg kleiner ist, noch unterhalb dieser Grenze liegt und abgedunkelt bleibt. Dieser Deutung entspricht die Beobachtung, daß es keine "kleinen" Glanzkörner gibt, sondern ihre Vorstufen homogen dunkel sind, und daß Glanzkörner relativ plötzlich auftreten, nämlich wenn ihr Durchmesser beim Heranwachsen eine Größe von etwa $1/2 \lambda$ übersteigt. Der zentrale Glanz kann demzufolge, was NOELLER bereits vermutet, als eine Inversionserscheinung aufgefaßt werden und als solche ist er lediglich Ausdruck der Größenordnung und des hohen Brechungsindex der Struktur. Es handelt sich also bei dem Glanzkorn-Phänomen um ein durch die Bildentstehung im Mikroskop bedingtes Phänomen, das wenig über die Struktur der Glanzkörner aussagt.

Zusammenfassend entnehmen wir den optischen Untersuchungen, daß Glanzkörner runde, $1/2 - 2 \mu$ große, anisotrope Strukturen mit geringer Lichtabsorption und höherem Brechungsindex sind, deren Zentren im positiven Phasenkontrast über $1/2 \mu$ eine Inversion zeigen.⁺

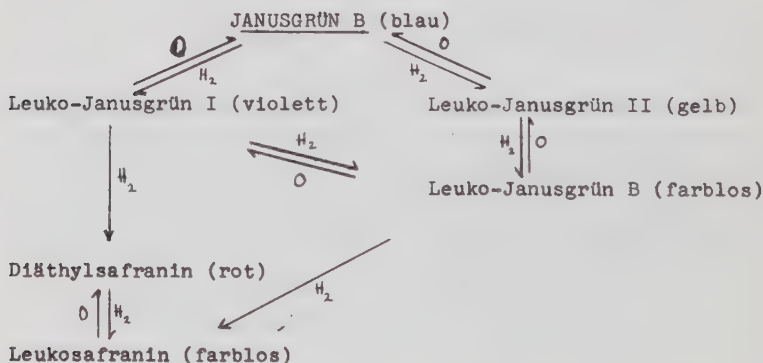
Die Bedeutung des positiven Ausfalles der Supravitalfärbung mit Janusgrün B ergibt sich aus Untersuchungen von LAZAROW und COOPERSTEIN (28).

Für den Färbefeffekt, die selektive Blau-Grün-Färbung von Mitochondrien formulieren diese Autoren ein durch ihre Versuchsergebnisse in fast allen Einzelheiten belegtes Modell, das wir (schematisch vereinfacht) wiedergeben:

Durch Absorption an Proteine wird der Farbstoff in allen Teilen der Zelle angereichert, weshalb auch mit geringer konzentrierten Lösungen eine Anfärbung erreichbar ist.

In Anwesenheit von reduziertem Flavoprotein wird das Diäthylsafranin-azo-dimethylanilin (Janusgrün B) über mehrere Zwischenstufen zu Leukosafranin (farblos) reduziert.

Die einzelnen Redoxstufen gibt die folgende Übersicht wieder:



⁺ Die der Deutung der optischen Ergebnisse zugrundeliegenden Modelle sind bei BEYER (6) und ADAM u. CZIHAK (2) dargestellt.

Die Reduktionsschritte benötigen reduziertes Flavonprotein, das in einer Oxydoreduktion reoxydiert wird; sie erfolgen also dort in der Zelle, wo durch Flavoprotein-DPN gekoppelte enzymatische Reaktionen ausreichend hohe Konzentrationen von reduziertem Flavoprotein im "Fließgleichgewicht" auftreten. Derartige Reaktionen sind praktisch ubiquitär, so daß unter geeigneten Bedingungen (d.h. die Zellen müssen über ausreichende "Reduktionskapazität" verfügen, s.u.) der Farbstoff überall bis zur Leukobase reduziert werden kann.

Lediglich in den Mitochondrien der lebenden Zelle unterbleibt diese Reduktion bei ausreichendem Sauerstoffangebot bzw. läuft stark verzögert ab, so daß der Farbstoff, der hier ebenfalls angereichert wird, in der blau-grün gefärbten, oxydierten Form erhalten bleibt. Der Sauerstoffbedarf - bei absoluter Anaerobiose sind auch die Mitochondrien entfärbt - dieser verzögerten Reduktion weist auf eine Abhängigkeit von aeroben Stoffwechselvorgängen hin.

Da die Verzögerung der Reduktion durch 0,001 molare Cyanidlösung reversibel hemmbar ist, scheint das Cytochrom-C-Cytochromoxydase-System, das durch Cyanid blockiert wird, für diese Verminderung der Reduktion des Farbstoffes verantwortlich zu sein. Die Wirksamkeit dieses Systems ist theoretisch auf zwei Wegen möglich:

Zum einen kann durch das Enzym-System selbst eine fortlaufende Reoxydation von Leuko-Janusgrün B erfolgen, so daß die weiteren, schließlich irreversiblen Reduktionsschritte unterbleiben. Eine solche reoxydierende Wirkung des Cytochroms C läßt sich zumindest für die Rückverwandlung von Leuko-Diäthylsafranin in rotes Diäthylsafranin nachweisen.

Zum anderen wird die Aktivität des Cytochrom-C-Cytochromoxydase-Systems die Konzentration an reduziertem Flavoprotein niedrig halten, so daß die hiervon abhängige Reduktion des Farbstoffes verzögert werden muß. Die selektive Blau-Färbung durch Janusgrün von Strukturen innerhalb der sonst ungefärb-

ten, lebenden Zellen ist damit ein recht spezifischer Nachweis für enzymatische Reaktionen, an denen Cytochrom C beteiligt ist, und gestattet die Lokalisation derartiger enzymatischer Vorgänge.

Die blau-grüne Anfärbung der Glanzkörner mit Janusgrün B beweist also, daß sie über ein intaktes Cytochrom-C-Cytochromoxydase-System verfügen. Um diesen Schluß zu erhärten, wollen wir mögliche Einwände entkräften. Diese könnten sich gegen die angewandte Methode richten. Fehler unserer Methode, die mit den Grundsätzen sowohl der Methode COWDRY's als auch der Methode LAZAROW's und COOPERSTEIN's übereinstimmt, können wir ausschließen. Besonders wird dem Sauerstoff vor der Beobachtung freier Zutritt gewährt, und die Reduktionskapazität der Zellen ist zumindest für die ersten Reduktionsschritte nicht überschritten, was der Ausfall der Färbung beweist; die Mitochondrien erscheinen blau-grün im farblosen Cytoplasma, das bei Überschreiten der Reduktionskapazität ebenfalls blau sein müßte. Die angewandte Farbstoff-Konzentration, auf die es hier im wesentlichen ankommt, liegt zwischen den von COWDRY mit 1:10000 und den von LAZAROW und COOPERSTEIN mit 1:100000 angegebenen Konzentrationen.⁺

Zum zweiten kann eingewendet werden, daß die blau-grün gefärbten großen, runden Granula keine Glanzkörner sind. Es könnte sich z.B. um geschwollene Mitochondrien handeln oder um die Anfärbung anderer Granula. Dieser Einwand scheint uns hinreichend widerlegbar, denn wir beobachten neben den großen, runden Granula die ungeschwollenen Mitochondrien, und an sich kann die blutisotone Farblösung kaum solche Schwellungen verursachen. Die hohe Spezifität der Färbung für Mitochondrien (s.u.) schließt die Möglichkeit, daß andere Granula, z.B. die spezifische Granulation der Granulocyten, angefärbt werden, aus, und derartige Färbeeffekte sind bisher auch

⁺ Die schwach rot-violette Anfärbung einiger Zellbezirke scheint durch Diäthylsafranin bedingt, und es ist möglich, daß die Reduktion zu Leukosafranin, die - wie bereits LAZAROW und COOPERSTEIN beschreiben - wesentlich langsamer als die ersten Reduktionsschritte verläuft, hier noch nicht abgeschlossen ist zum Zeitpunkt der Beobachtung.

,nie beschrieben worden. Mithin können die großen blau-grünen Granula, wenn sie nicht geschwollene Mitochondrien sind, nur aus diesen abgeleitete Derivate sein, und als solche sprechen wir die Glanzkörner, wie unten ausgeführt wird, an. Schließlich entspricht die Häufigkeit, mit der wir derartige große blau-grüne Granula in inkubierten Zellen beobachten, der bereits beschriebenen Häufigkeit von Glanzkörnern nach Zellzuchtung.

Der negative Ausfall aller Farbreaktionen mit Ausnahme der Sudanschwarz-Färbung nach SHEEHAN und STOREY und die Ergebnisse der Löslichkeitsversuche kennzeichnen die Baustoffe der Glanzkörner als eine besondere Art fettähnlicher Substanzen. Die fettähnlichen Substanzen werden unter dem Sammelbegriff "Lipide" bezeichnet, und diese Substanzgruppe enthält verschiedenartige organische Stoffe, deren eigentliches gemeinsames Charakteristikum ein negatives Merkmal, ihre Wasserunlöslichkeit ist (FREY-WYSSLING (21)). Dieser negativen Eigenschaft steht eine mehr oder minder gute, durch Mischung beeinflussbare Löslichkeit in Alkoholen und anderen organischen Lösungsmitteln als positives, schon nicht mehr für alle Substanzen völlig gleichartiges Kennzeichen gegenüber. Das Verhalten der Lipide gegen Lösungsmittel ist durch einen hohen Gehalt an apolaren Kohlenwasserstoffresten bestimmt; im übrigen ist diese Substanzgruppe, zu der neben den klassischen Neutralfetten und den Wachsen auch die sog. Lipide (= zusammengesetzte Lipide), die Steroide, die Karbonyl-Lipide, die Lipopigmente und die Isoprenabkömmlinge gehören, chemisch recht uneinheitlich hinsichtlich der Molekülbausteine und ihres Verknüpfungsprinzips zu Lipidmolekülen (CLARA (15)).

Da die Klasse der Lipide in erster Annäherung durch ihre Löslichkeitseigenschaften gekennzeichnet ist, es sich also streng genommen um eine physikochemisch definierte Substanzgruppe handelt, ist ihr histochemischer Nachweis mehr eine

physikalische Untersuchung als eine chemische Analyse. Neben dem erwähnten Verhalten gegen Lösungsmittel ist für den histochemisch-topographischen Nachweis die Anfärbbarkeit mit bestimmten fettlöslichen Farbstoffen wesentlich. Nach einer in den Grundzügen von MICHAELIS (38) entwickelten Theorie ist diese Darstellung der Lipide mit Fettfarbstoffen ein reiner Lösungsvorgang, und der Färbefeekt ist bedingt durch "das Verhältnis der Affinitätsgrößen des Farbstoffes zu den drei konkurrierenden Lösungsmedien: Fett, Gewebe und Lösungsmittel" (EISENBERG (18)). Die Darstellung der Lipide durch die Fettfarbstoffe ist also theoretisch kaum eine Bindung zwischen Strukturmolekülen und Farbstoffmolekülen, sondern nur eine Farbstoffanreicherung durch Lösungsvorgänge.

Die bekanntesten und gebräuchlichsten Lysochrome sind die Azofarbstoffe Sudan III und Sudanschwarz B. Dem Sudanschwarz B wird dabei die größte Färbebreite aller Fettfarbstoffe zugesprochen. Mit diesem Farbstoff sind selbst Granulocyten-Granula (McMANUS (36)) und Markscheiden (LISON (32)) darzustellen, was mit keinem anderen Fettfarbstoff ohne weiteres gelingt. Die Lipid-Spezifität des Sudanschwarz B ist allerdings umstritten. SCHOTT (52) färbt mit der isolierten blauen Fraktion, die den Hauptanteil des käuflichen Farbstoffgemisches ausmacht, nicht nur Lipide, sondern weist auch eine Anfärbung von Proteinen und sauren Mukopolysacchariden nach. HERMANSKY (24, 25) erhält nach Vorbehandlung der Präparate mit Quecksilberionen und bei Austausch der Farbstoff-Lösungsmittel mit der Methode von SHEEHAN und STOREY derart verschiedene Färbeargebnisse, daß "berechtigte Zweifel an der Lipidnatur aller angefärbten Strukturen auftreten". Ein weiteres Argument gegen die absolute Lipid-Spezifität des Sudanschwarz B ergibt sich aus der schlechten Reversibilität der Färbung nach längeren Farbstoffeinwirkungen, die der theoretischen Deutung des Färbeprozesses als einer Farbstoffanreicherung durch Lösungsvorgänge widerspricht. Mit Sudanschwarz B dargestellte Lipide müßten entsprechend der Theorie der lyso-

chromen Fettfärbung eine verhältnismäßig leichte Eluierbarkeit des Farbstoffes besitzen, da dieser nur in hoher Konzentration gelöst ist und nicht an Strukturbestandteile gebunden vorliegt. Dies ist aber nicht immer gegeben, und so halten z. B. die spezifischen Granula der Granulocyten den Farbstoff nach einiger Einwirkungszeit außerordentlich stark fest. Über das Problem der "sudanfesten Granula" existiert bereits eine umfangreiche Literatur, die bei CLARA (15) zusammengestellt ist. Wir werden, da sich auch die Glanzkörner als sudanfeste Granula erweisen, weiter unten darauf zurückkommen.

Das Prinzip des topographischen Lipidnachweises durch Bestimmung der Löslichkeitseigenschaften und der Eigenschaften als Lösungsmittel für Lysochrome ist unbeschränkt nur dort anwendbar, wo Lipide in mikroskopisch wahrnehmbarer Größenordnung als homogene Phase auftreten, da die hiermit charakterisierten physikalischen Eigenschaften sowohl durch feindisperse Verteilung als auch durch Zumischung nicht lipiden Materials wesentlich verändert werden können.

LISON (32) unterscheidet daher aufgrund des histochemischen Verhaltens zwischen den homophasischen Lipiden und den heterophasischen Lipiden: Die homophasischen Lipide sind von der hydrophilen Phase des Protoplasmas scharf getrennte, rundlich begrenzte Einschlüsse, da sie sich wegen ihres hydrophoben Charakters nicht mit dieser mischen. Die heterophasischen Lipide kommen nur in einem komplizierten Verband mit anderen Bestandteilen vor und zeigen je nach der submikroskopischen Organisation unterschiedliches Verhalten. Im wesentlichen sind unter den heterophasischen Lipiden zwei Zustandsformen abzugrenzen, wobei die Übergänge fließend sein können:

eine Beteiligung der Lipide an Membran und Folienbildungen (z.B. der Phosphorlipide, die ein extrem hydrophobes und ein extrem hydrophiles Ende besitzen);

eine irgendwie geartete (adsorptive oder komplexbildende) Verbindung zwischen Lipiden und nicht lipidem Material, die die bezeichnenden physikochemischen Eigenschaften nicht in Erscheinung treten läßt.

Derartig "maskierte Lipide" können erst nach künstlicher Lipophaneroze histochemisch nachgewiesen werden. MAURI (35) nennt daher als cytochemische Merkmale "maskierter Lipide" ihre Demaskierungsfähigkeit, ihre Färbemöglichkeit und ihre Extrahierbarkeit.

Das Problem der "maskierten Lipide" ist noch weitgehend ungeklärt; einige Verhaltensweisen sind jedoch hinreichend bekannt und gesichert:

So fällt z.B. auf, daß die "maskierten Lipide" gegen Extraktion mit Äther und anderen Fettlösungsmitteln sehr widerstandsfähig sind, während sie durch Methanol und Äthanol sehr leicht extrahiert werden können (BIEDERMANN (7)). Die an sich schlechten Fettlöser Äthanol und Methanol vermögen die unfixierten "maskierten Lipide" in ihre Bestandteile zu zerlegen (NATH, GUPTA, LAL (39)).

Demaskierende Wirkung auf fixierte "maskierte Lipide" besitzt Phenol, das sich bereits in 1-%iger Lösung (in 24 Stunden) als sehr brauchbares lipopharmarogenes Agens erweist (MANFREDI ROMANINI (34)). Nicht zuletzt scheint eine Nachahmung der biologischen Lipophaneroze durch proteolytische Enzyme, wie sie z.B. BERG (4) mit Pepsinlösung vornimmt, sehr sinnvoll.

Die Methode von SHEEHAN und STOREY, die ursprünglich für die Darstellung der spezifischen Granula der Granulocyten angegeben wurde, entspricht in allen Parametern den angegebenen Prinzipien der Nachweisverfahren "maskierter Lipide":

1. Sie wird an Formoldampf-fixierten Präparaten ausgeführt, berücksichtigt also eine eventuell vorhandene Instabilität komplexer Strukturen durch einen stabilisierenden Eingriff;
2. Sie enthält 12 % Phenol und ist daher zur künstlichen Lipophaneroze geeignet;

3. Das Lysochrom wird in einer übersättigten Lösung in einem schlechten Fettlösungsmittel angeboten, wodurch eine Anreicherung des Farbstoffes in der Lipidphase mit ihren guten Lösungseigenschaften begünstigt wird;
4. Das angewandte Sudanschwarz B besitzt eine große Färbbreite für Lipide, kann allerdings auch nicht lipidisches Material u.U. zur Darstellung bringen.

Bedingt durch die hohe Färbbreite des Sudanschwarz B stellt die angewandte Methode eine ganze Reihe, u.a. auch glanzkorngroßer runder Granula dar, und diese Darstellungsbreite erfordert die phasenkontrastmikroskopische Kontrolle der Färbeergebnisse an den Glanzkörnern. Die von RIND und OTTO (47) angegebene Phasenkontrastkontrolle ist dazu nicht geeignet, da sich die Farbstofflösung in der wässrigen Phase unter dem Deckglas entmischt und der Farbstoff am Beginn der kapillaren Strecke niedergeschlagen wird. Deshalb entwickeln wir eine eigene Methode, bei der im Prinzip das Präparat mit der Farblösung überschichtet wird.

Setzen wir die Ergebnisse unserer Versuche in Beziehung zu dem hier Erörterten über Lipide und ihre Darstellbarkeit, so kommen wir zu folgenden Aussagen:

1. Der negative Ausfall der panchromatischen Färbung macht das Vorliegen einer fettähnlichen Substanz vermutbar, die unter der Einwirkung des absoluten Methanols aus der Struktur gelöst werden könnte.
2. Da sich die Glanzkornsubstanz aber weder mit der Sudan-III-Färbung nach DADDI noch mit der Sudanschwarz-B-Färbung nach LISON darstellen läßt, kann ein homophasisches Lipid mit Sicherheit ausgeschlossen werden.
3. Die Methode nach SHEEHAN und STOREY, mit der wir die Glanzkörner darstellen können, ist zwar im Prinzip

zum Nachweis "maskierter Lipide" geeignet, macht also das Vorliegen derartiger Substanzen in den Glanzkörnern wahrscheinlich, ist aber wegen der umstrittenen Lipid-Spezifität des Sudanschwarz B nicht absolut beweisend hierfür, denn es besteht zumindest die Möglichkeit, daß auch nicht lipidisches Material vom Sudanschwarz B dargestellt werden könnte.

4. Erst im Zusammenhang mit den Löslichkeitsuntersuchungen am unfixierten Material, wobei sich die Glanzkörner als schlecht ätherlöslich und gut in Methanol und Äthanol lösbar erweisen und damit ein Verhalten zeigen, wie es für "maskierte Lipide" kennzeichnend ist, dürfen wir die Darstellbarkeit der Glanzkornsubstanz mit der Methode nach SHEEHAN und STOREY als einen Nachweis "maskierter Lipide" betrachten.
5. Auf - vermutlich durch Komplexbildung z.B. mit einem Protein maskierte - Lipidbausteine der Glanzkörner weist die primäre Schwärzung durch Osmiumtetroxyd, die wir nach HOERR (26) als Nachweis ungesättigter Doppelbindungen auffassen, bereits hin. Ebenso stimmt der hohe Brechungsindex mit einem derartigen Aufbau der Glanzkörner gut überein.
6. Lediglich die schlechtere Reversibilität der Sudanschwarz-B-Färbung nach SHEEHAN und STOREY an den Glanzkörnern widerspricht scheinbar einer Deutung der Färbung als Nachweis "maskierter Lipide".

Den scheinbaren Widerspruch gegen die Lipid-Spezifität der Sudanschwarz-B-Färbung, der sich aus der verschlechterten Eluierbarkeit des Farbstoffes bei fortschreitender Färbung ableiten läßt, könnte die nachfolgend dargelegte modellmäßige Deutung des Färbevorganges überbrücken. Dieses Modell für den Färbeprozess ergibt sich aus dem optisch kontrollierten Verlauf der fortschreitenden Färbung und ihrer Reversibilitätsverschlechterung in Abhängigkeit von der Dauer der Farbstoffeinwirkung:

Die zu Beginn der Färbung an den Glanzkörnern beobachtete Schwellung kann Ausdruck der Molaritätserhöhung durch die Aufspaltung der Lipidkomplexe sein. Die anfänglich bevorzugte Schwärzung der Glanzkörner gegenüber dem restlichen Cytoplasma ist wahrscheinlich Ausdruck der besseren Löslichkeit des Sudanswarz B in den frei werdenden Lipiden. Zu diesem Zeitpunkt ist das in der Struktur gelöste Sudanswarz B noch relativ leicht zu eluieren. Die bei fortschreitender Färbung und Differenzierung beobachtete Schrumpfung der geschwellenen Glanzkörner ist u.U. Ausdruck der Elution des Lipids durch das Lösungsmittel des Farbstoffes. Der ursprünglich durch die bessere Löslichkeit angereicherte Farbstoff könnte nun bei Elution des Lipids sekundär an die nicht lipide Komponente des "maskierten Lipids" gebunden werden, was fortschreitende Irreversibilität der Färbung zur Folge hätte. Wenn wir die Lipid-Spezifität des Sudanswarz B bestreiten, müssen wir ihm derartige Bindungsmöglichkeiten zubilligen.

Die Färbungen und die Löslichkeitsversuche machen das Vorliegen eines "maskierten Lipids" in den Glanzkörnern wahrscheinlich. Auch die schlechte Reversibilität der Sudanswarz-B-Färbung muß dieser Annahme nicht unbedingt entgegenstehen.

Zu 2.: Wie die Lebendbeobachtung ergibt, ist die Glanzkornhäufigkeit in kultivierten Zellen, gleich welcher Art, augenscheinlich höher als die Häufigkeit in den vitalen und supravitalen Zellen. Daraus folgt mit Sicherheit, daß Glanzkörner in den Kulturzellen entstehen, und mit einiger Wahrscheinlichkeit, daß es die Inkubationsbedingungen sind, die eine Glanzkornbildung verursachen können.

Der in Glanzkörnern nachgewiesene Cytochrom-C-Cytochromoxydase-Gehalt legt es nahe anzunehmen, daß sie transformierte Mitochondrien sind, denn dieses Fermentsystem kommt nach Untersuchungen von SCHNEIDER (51), HOGEBOM (27) und RECKNAGEL (44) fast ausschließlich in Mitochondrien vor, ist also praktisch mitochondrienspezifisch. Die Umwandlung ist wohl im wesentlichen eine Einlagerung maskierter Lipide, wie wir in den Glanz-

körnern aller Zellarten wahrscheinlich machen können, und eine entsprechende, fortschreitende Größenzunahme. Wir nehmen nicht an, daß es sich dabei um eine degenerative Erscheinung handelt, da die glanzkornhaltigen Zellen, in der Regel nach Beweglichkeit, Oberflächenaktivität, Granulabewegung, Kernstruktur und Mitoseaktivität beurteilt, vital sind, und vor allem da wir - in Übereinstimmung mit BOLL - gelegentlich die Rückbildung der Glanzkörner beobachten.

Unsere Untersuchungen reichen nicht aus, die Ursachen der Umwandlung von Mitochondrien in Glanzkörner aufzudecken. Berücksichtigen wir, daß die Morphe relativ ausdrucksarm ist im Verhältnis zur Vielzahl möglicher funktioneller Veränderungen, dann scheint es nicht unmöglich, daß verschiedene Funktionszustände diese Transformation hervorrufen können, zumal es sich um eine ziemlich allgemeine, in verschiedenen Zellen beobachtbare Veränderung handelt, die bereits in vivo in den Zellen anscheinend gesunder Individuen möglich ist und für deren Vermehrung z.B. in Lymphocyten Beziehungen zu einer Störung der Leberfunktion nachgewiesen sind. Wir haben keine auffälligen Zusammenhänge zwischen pathologischen Zuständen des Gesamtorganismus und der Glanzkornbildung in den Kulturzellen feststellen können und nehmen daher an, daß die Zustandsänderung, die die Glanzkornbildung in der Kultur verursacht, auf zellulärer Ebene wirksam ist.

Feste Beziehungen zur Zellaktivität, speziell der Oberflächenaktivität, die Ausdruck resorptiver oder sekretorischer Vorgänge sein könnten, beobachten wir bei der Glanzkornentstehung nicht. Daß die Einlagerung "maskierter Lipide" in den Mitochondrien durch Ablagerung resorbierten Materials zustande kommt, ist zumindest in den inkubierten Zellen sehr unwahrscheinlich, denn wir kennen die Zusammensetzung unserer Kulturmedien und wissen, daß sie nicht viel Lipide enthalten können, und resorbiertes Material würde wohl kaum derart komplex zusammengesetzt sein, wie es die "maskierten Lipide" der Glanzkörner sind. Es ist viel wahrscheinlicher, daß die eingelager-

ten komplexgebundenen Lipide unmittelbar am Ort ihrer Ablagerung in der Zelle gebildet werden.

DESSBERGER (17) beschreibt, daß inkubierte Zellen wahrscheinlich unter dem Einfluß oligomerer Silikate aus den Inkubationsgefäßen überwiegend anaeroben Stoffwechsel haben. Nach den allgemein anerkannten Auffassungen vom aeroben Stoffwechsel und der Bedeutung der Mitochondrien hierbei (50) ist ein Zusammenhang zwischen einer Mitochondrien-Transformation, die mit Lipideinlagerung einhergeht, und einer gestörten Aerobiose denkbar.

Ein weiterer Hinweis auf eine derartige Deutung könnte die Beobachtung sein, daß im "platten Präparat", wo ein besonders enger Kontakt zwischen Glas und Zellen besteht, besonders häufig Glanzkörner entstehen. Es leuchtet ein, daß eine solche Veränderung an isolierten Zellen auftritt und ziemlich unabhängig von der Zellart ist.

Die Glanzkörner inkubierter Zellen sind mithin durch Einbau komplexer Lipide transformierte Mitochondrien. Wir bezeichnen sie mit RIND als Lipocondrien. Derartige Transformationen werden durch die Kulturbedingungen begünstigt, wofür eine Hemmung der Aerobiose in der Kultur Ursache sein kann. Unsere Untersuchungsergebnisse bzw. die Schlüsse, die wir daraus auf die Natur der Glanzkörner ziehen müssen, bestätigen damit, was RIND (45) für Lymphocyten-Glanzkörner und was STOBBE (55) für Plasmazell-Glanzkörner - beide mit anderen Methoden - nachweisen, und sie zeigen uns, daß derartige Umwandlungen von Mitochondrien in einer Reihe von Zellen möglich sind.

VI. Zusammenfassung:

Glanzkörner werden mit wechselnder Häufigkeit in Lymphocyten, Plasmazellen, Monocyten, Phytozellen, Myeloblasten, Promyelocyten, Myelocyten, eosinophilen Myelocyten, stabkernigen, segmentkernigen, eosinophilen Granulocyten, Proerythroblasten, basophilen, polychromatischen Erythroblasten und Megacaryocyten beobachtet. Sie werden durch die Untersuchungsergebnisse als morphologisch einheitliche, reversible Varia in allen untersuchten Zellen erkannt. Der zentrale Glanz wird als abbildungsbedingtes Phänomen gedeutet, das lediglich Ausdruck eines hohen Brechungsindex' der Glanzkörner ist. Durch den Nachweis von Cytochromoxydase mit der Januserün-B-Färbung wird eine Beziehung zu Mitochondrien festgestellt. Histochemische Untersuchungen weisen mit Wahrscheinlichkeit "maskierte Lipide" als wesentlichen Baubestandteil der Glanzkörner nach. Glanzkörner werden daher in allen haematoetischen Zellen als Lipo-chondrien aufgefaßt. Aufgrund der steigenden Glanzkornhäufigkeit mit der Inkubationsdauer werden die Inkubationsbedingungen als mögliche Ursachen der Glanzkornbildung aufgefaßt und diskutiert.

VII. Literaturverzeichnis:

1. Ackermann, G.A. and N.C. Bellios: A study of the morphology of the living cells of blood and bone marrow in vital films with the phase contrast microscope. Blood 10, 3 (1955)
2. Adam, H. und G. Czihak: Arbeitsmethoden der makroskopischen und mikroskopischen Anatomie. (Fischer, Stuttgart 1964)
3. Astaldi, G.: Das Phytohaemagglutinin und das Problem des Lymphocyten. Med. Klin. 59, 368 (1964)
4. Berg, N.O.: A histological study of masked lipids. Acta path. microbiol. scand. 90, 1 (1951)
5. Bessis, M.: Traité de cytologie sanguine. (Masson et Cie, Paris 1954)
6. Beyer, H.: Das Phasenkontrastverfahren, in: RIND, H.: Atlas der Phasenkontrasthaematologie (Akademie-Verlag, Berlin 1958)
7. Biedermann, W.: Über Wesen und Bedeutung der Protoplasma-lipide. Pflügers Arch. ges. Physiol. 202, 223 (1924)
8. Boll, I.: Granulocytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. (Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1966)
9. Boll, I.: Morphologische Studien zum Verhalten von Knochenmarkzellen in vitro. II. Ausreifung eines Myelocyten zum Segmentkernigen. Folia haemat. 3, 78 (1958)
10. Boll, I.: Morphologische Veränderungen einer Plasmocytomzelle während 4 Tagen in vitro. Blut 14, 351 (1967)
11. Boll, I.: Sekretionsvorgänge an malignen Mesothelien. Z. Zellforsch. 82, 239 (1967)
12. Boll, I.: persönliche Mitteilung unveröffentlichter Beobachtungen mit Dokumentation.
13. Boll, I. und G. Fuchs: Vereinfachtes Verfahren zur kurzfristigen Kultivierung von menschlichem Knochenmark in vitro. Blut 7, 257 (1961)
14. Boll, I., V. Kretschmer und T.M. Fließner: Kinematographische Dokumentation einer amitotischen Zellteilung. Z. Zellforsch. 83, 1 (1967)

15. Clara, M.: Methoden der Lipidhistochemie, in:
Handbuch der Histochemie, Bd. 5, 1
(Fischer, Stuttgart 1965)
16. Cowdry, E.V.: The vital staining of mitochondria with
Janusgreen and diethylsafranin in human blood cells.
Int. Mschr. Anat. Physiol. 31, 267 (1965)
17. Desseberger, U.: Über die Ursachen der Entstehung von Gär-
ungsstoffwechsel in der Gewebekultur.
Diss. (Berlin 1967)
18. Eisenberg, P.: Über Fettfärbung.
Virchows Arch. path. Anat. 199, 502 (1910)
19. Elves, M.W., J. Gough, J.A. Chapman and M.C.G. Israëli:
Electron microscopy studies of lymphocytes. Trans-
formation under the influence of phytohaemagglutinin.
Lancet I, 306 (1964)
20. Favier, P., M. Viette, M. Saint-Paul et J.F. Duplan: Méthode
simplifiée du culture de leucocytes a partir de sang
humain. Influence de la phaséoline.
Nov. Rev. franc. Hémat. 1, 872 (1961)
21. Frey-Wyssling, A.: Submikroskopische Morphologie des Cyto-
plasmas, in
Handbuch allg. Path. 2, I
(Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1956)
22. Gall, E.A.: A previously undescribed granule within the
lymphocyte.
Amer. J. med. Sci. 191, 380 (1936)
23. Hempelmann, L.H. and N.P. Knowlton jr.: The nature of neu-
tral red staining refractive particles.
Blood 8, 224 (1953)
24. Heřmanský, F.: Zur Frage der Sudanophilie und des Lipidge-
haltes von Blut- und Knochenmarkzellen.
Folia haemat., Leip., 85, 236 (1966)
25. Heřmanský, F.: Sudanofilia and lipids in the blood and
marrow cells.
Histochem. 5, 303 (1965)
26. Hoerr, N.L.: Histochemical studies on lipins. I. Osmic acid
as a microchemical reagent with special references to
lipins.
Anat. Rec. 66, 149 (1936)
27. Hogeboom, G.H., A. Claude, R.D. Hotchkiss: The distribu-
tion of cytochrome-oxidase and succinoxidase in the
cytoplasm of the mammalian liver cells.
J. biol. chem. 165, 585 (1946)

28. Lazarow, A. and S. I. Cooperstein: Studies of the mechanism of Janus green B staining of mitochondria. *Exp. Cell. Res.* 5, 56 (1953)
29. Lazarus, S.S., V.G. Vethamany and B.W. Volk: Fine structure of phytohemagglutinin transformed lymphocytes. *Arch. Path.* 86, 176 (1968)
30. Lennert, K.: Lymphknoten, Diagnostik in Schnitt und Ausstrich, in: *Hdb. spez. path. Anat. u. Histologie*, Bd. 1, III, S. 73 (Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1961)
31. Li, J.G. and E.E. Osgood: A method for the rapid separation of leukocytes and nucleated erythrocytes from blood or marrow with phytohemagglutinin from red beans. *Blood* 4, 670 (1949)
32. Lison, L.: *Histochemie et cytochemie animales. Principes et méthodes.* 3. Aufl. (Masson, Paris 1961)
33. Lison, L. et J. Daguelie: Methodes nouvelles de la coloration de la myéline. *Bull. Histol. appl.* 12, 85 (1953)
34. Manfredi-Romanini, M.G.: Effetto di alcuni tipi di lipofanerosi sulla cellula delomorfa del topino. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* 36, 291 (1960)
35. Mauri, C.: Über Lipide und ihre Bedeutung in den Zellen der blutbildenden Systeme. *Freiburger Symposion Nr. 9*, 433 (1962)
36. McManus, J.F.A.: Granules of human polymorphonuclear leukocytes. *Nature (Lond.)* 156, 173 (1945)
37. Medawar, J.: Observations on lymphocytes in tissue culture. *Brit. J. exp. Path.* 21, 205 (1940)
38. Michaelis, L.: Zur Theorie der Fettfärbung. *Dtsch. med. Wschr.* 27, 753 (1901)
39. Nath, V., Gupta, B.L. and Lal, B.: Histochemical and morphological studies of lipids in the oogenesis. I. *Periplaneta americana*. *Quart. J. micr. Sci.* 99, 315 (1958)
40. Noeller, H.G.: Phasenkontrastmikroskopische Beobachtung an Blutzellen bei Hepatitis epidemika. *Ärztl. Forsch.* 6, 185 (1952)
41. Nowell, P.C.: Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* 20, 462 (1960)
42. Pössnerova, V.: Some cytochemical investigations on leukocytes from the peripheral blood cultivated in vitro. *Folia morphol.* 15, 160 (1967)

43. Quadagno, D., U. Torelli, S. Sauli and C. Mauri: Cytochemical and autoradiographic investigations on normal and myelomatous plasm cells.
Acta haemat. 38, 79 (1967)
44. Recknagel, R.O.J.: Localisation of cytochrome-oxidase on the mitochondria of the frog egg.
J. cell. comp. Physiol. 35, 111 (1950)
45. Rind, H.: Histochemie der Lymphocyten glanzkörper.
Klin. Wschr. 33, 731 (1955)
46. Rind, H.: Atlas der Phasenkontrasthaematologie.
(Akademie-Verlag, Berlin 1958)
47. Rind, H. und F.M.G. Otto:
Die Phakopräparatfärbung.
Folia haemat. Lpz., 72, 113 (1954)
48. Romeis, B.: Mikroskopische Technik.
(Leibniz, München 1948)
49. Rosse, C. and Yoffey, J.M.: The morphology of the transitional lymphocyte in Guinea-pig bone marrow.
J. Anat. 102, 113 (1967)
50. Schmid, F.: Mitochondrien.
Fortschr. Med. 85, 286 (1967)
51. Schneider, W.C., A. Claude and G.H. Hogeboom: The distribution of cytochrom C and succinoxidase activity in rat liver fractions.
J. biol. Chem. 172, 451 (1948)
52. Schott, H.J.: Zur Frage der histochemischen Fettspezifität des Sudanswarz B und zur Methodik der Auftrennung seiner Fraktionen.
Histochemie 3, 467 (1964)
53. Sheehan, H.L.: Staining of leukocyte granules with sudan black B.
J. Path. Bact. 49, 580 (1939)
54. Sheehan, H.L. and G.W. Storey: An improved method of staining leukocyte granules with sudan black B.
J. Path. Bact. 59, 336 (1947)
55. Stobbe, H.: Die Strukturelemente der Plasmazelle.
Folia haemat., N.F., 2, 305 (1958)
56. Stobbe, H.: Die Zellstruktur der Plasmazelle.
Vortrag vom 4. 2. 1958, gehalten auf einem Haematologenkolloquium in Berlin (nicht gedruckt)
57. Tanaka, Y.; L.B. Epstein, G. Brecher, F. Stohlmann jr.: Transformation of lymphocytes in cultures of human peripheral blood.
Blood 22, 614 (1963)

58. Trowell, O.A.: The lymphocyte.
Int. Rev. Cytol. 7, 235 (1958)
59. Wennig, F.: Serum Lipoperoxidasespiegel und Lymphocyten-
glanzkörper bei Hepatitis epidemica.
Klin. Wschr. 96, 313 (1958)

Ich danke Frau Privatdozentin Dr. med. I. B o l l für das
Thema, die freundliche Unterstützung dieser Arbeit und viele
nützliche Ratschläge.

L e b e n s l a u f

Ich bin am 10. August 1940 als Sohn des Johann B e i s - s e l und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Hocks, in Eschweiler, Kreis Aachen, geboren.

Ostern 1947 war meine Einschulung in die katholische Volksschule Eschweiler-Rötheen (Karls-Schule), die ich vier Jahre besuchte.

Ostern 1951 kam ich in die Sexta des naturwissenschaftlichen Gymnasiums Eschweiler, wo ich nach neun Jahren mein Abitur bestand.

Im Sommersemester 1960 begann ich ein Medizinstudium an der Phillips-Universität in Marburg und legte dort meine naturwissenschaftliche und ärztliche Vorprüfung ab. Nach einem klinischen Semester setzte ich mein Studium im Wintersemester 1963 an der Freien Universität Berlin fort, wo ich am 21. 3. 1967 meine ärztliche Prüfung bestand.

Seit dem 1. 5. 1967 arbeite ich als Medizinalassistent: 6 Monate auf der chirurgisch-orthopädischen Abteilung des Städt. Krankenhauses Britz von Berlin, 4 Monate als Angestellter der Deutschen Forschungsgemeinschaft bei Prof. Dr. med. K. Holldack im Städt. Krankenhaus Neukölln von Berlin, 6 Monate auf der I. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses Neukölln von Berlin, 4 Monate auf der chirurgischen Abteilung des Rittberg-Krankenhauses vom Deutschen Roten Kreuz in Berlin-Lichterfelde und 3 Monate in der Frauenklinik Peters in Berlin-Charlottenburg.

Seit dem 30. 12. 1968 bin ich mit Roswitha, Regina von Westernhagen verheiratet.

Das vorliegende Dissertationsthema bearbeite ich seit November 1967 im Haematologischen Labor von Frau Priv.-Doz. Dr. med. I. Boll.

